

Trabajo de Final de Máster

Máster Universitario en Ingeniería Industrial (MUEI)

Estudio de la recuperación de metales mediante la síntesis de nanopartículas metálicas: Cu

MEMORIA

Autor: Aarón Miguel Huánuco Ramos
Director: Antonio Florido Pérez
Ponente: María del Rosario Martínez Martínez
Convocatoria: Julio 2017



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Industrial de Barcelona



Resumen

Se estudió la síntesis verde de nanopartículas metálicas de cobre usando como agente reductor y estabilizante extracto de raspo de uva. El trabajo está encaminado a la investigación de los diferentes parámetros que controlan el mecanismo de formación de las nanopartículas y su monitorización mediante el uso de espectros UV-Vis.

Las condiciones con que se trabaja tienen por objetivo dirigir los protocolos de síntesis hacia el uso de aguas ácidas de minas como fuente de metales para la formación de nanopartículas y, así, conseguir reutilizar los residuos vegetales al mismo tiempo que se remedian las aguas contaminadas.

En primer lugar se trabajó la optimización de la preparación del extracto vegetal en función del tamaño de partícula del raspo, y la parte que lo origina: pedicelos/raquis. Se realizaron estudios del contenido de polifenoles en forma de equivalentes de ácido gálico (método Folin-Ciocalteu), estudios de los azúcares reductores (método Rebelein) y medidas del pH.

Luego se exploró, la modificación de parámetros como las concentraciones de cobre o la cantidad de extracto y su efecto en el espectro UV-Vis observado. También se siguió el desarrollo del espectro UV-Vis en función del tiempo.

Finalmente, también se vio el efecto de realizar los análisis UV-Vis en función de la temperatura de la muestra y el efecto del filtrado final antes del análisis.

Sumario

RESUMEN	1
SUMARIO	3
1 GLOSARIO	7
2 PREFACIO	9
2.1 Origen del proyecto	9
3 INTRODUCCIÓN	11
3.1 Objetivos del proyecto	11
3.2 Alcance del proyecto	11
4 LA NANOTECNOLOGÍA	13
4.1 ¿Qué es la nanotecnología?	13
4.2 Tipos de nanoestructuras	13
4.3 Propiedades y aplicaciones de las nanopartículas	14
4.4 Síntesis de nanopartículas	14
4.4.1 Mecanismo de síntesis y formación de nanopartículas	15
4.4.2 Parámetros de control de la reacción	16
4.5 La química verde	17
5 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	21
5.1 Espectroscopia UV-Vis	21
5.2 Microscopio electrónico de barrido (SEM)	22
5.3 EDX o EDS	23
6 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO	25
6.1 Adecuación del raspo de uva	25
6.2 Preparación del extracto de raspo de uva	28

6.2.1	Materiales, reactivos e instrumentos	29
6.2.2	Extracción por reflujo.....	29
6.2.3	Filtrado por gravedad	30
6.2.4	Filtrado al vacío	30
6.2.5	Centrifugado y filtrado 0,2 µm.....	31
6.3	Cuantificación de polifenoles.....	31
6.3.1	Materiales, reactivos e instrumentos	32
6.3.2	Procedimientos.....	32
6.4	Cuantificación de azúcares reductores.....	34
6.4.1	Materiales, reactivos e instrumentos	36
6.4.2	Procedimiento	36
6.5	Medición del pH.....	37
7	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS	39
7.1	Preparación del catión metálico	39
7.1.1	Disolución de Nitrato de cobre (II)	39
7.1.2	Disolución de Nitrato de Zinc	39
7.1.3	Disolución de Nitrato de Cadmio	40
7.1.4	Aguas de minas.....	40
7.2	Síntesis en tubos de ensayo	40
7.2.1	Materiales, reactivos e instrumentos	40
7.2.2	Síntesis	40
7.3	Síntesis en vasos de precipitados.....	41
7.3.1	Materiales, reactivos e instrumentos	41
7.3.2	Síntesis	41
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
8.1	Polifenoles, azúcares reductores y pH	43

8.2	Los metales estudiados: Cu, Zn, Cd	45
8.3	Efecto de la concentración utilizada.....	46
8.4	Efecto de la proporción de extracto.....	48
8.5	Efecto del extracto utilizado.....	49
8.6	Efecto del tiempo	51
8.7	Efecto del filtrado	52
8.7.1	Análisis SEM y EDX	54
8.8	Efecto de la temperatura en la medición UV-Vis	56
8.9	Ensayos con muestras reales: aguas ácidas de mina	56
8.9.1	Análisis SEM y EDX	58
8.10	Monitorización continua del espectro UV-Vis.....	59
9	EVALUACIÓN DEL IMPACTO AMBIENTAL	61
10	PLANIFICACIÓN TEMPORAL Y ECONÓMICA.....	63
10.1	Planificación temporal.....	63
10.2	Planificación económica	63
11	RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES FUTURAS ____	65
12	CONCLUSIONES	67
	AGRADECIMIENTOS	69
	LISTA DE FIGURAS	70
	LISTA DE TABLAS	72
	LISTA DE ECUACIONES	72
	BIBLIOGRAFÍA	73

1 Glosario

CSTR: *Continuous stirred-tank reactor* o reactor continuo de tanque agitado.

EDX: *Energy-dispersive X-ray spectroscopy*.

EDS: *Energy Dispersive Spectroscopy*, sinónimo de EDX.

NP: Nanopartículas.

PRF: *Plug flow reactor* o reactor en flujo pistón.

SEM: *Scanning Electron Microscope*.

TEM: *Transmission Electron Microscopy*.

2 Prefacio

2.1 Origen del proyecto

El presente Trabajo de Final de Máster es una contribución al proyecto de investigación "Síntesis Verde de Nanopartículas Metálicas a partir de Aguas Ácidas de Mina y Extractos de Residuos Agroalimentarios", financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, Madrid, y fondos FEDER, EU, 2016-2018 (proyecto CTM2015-68859-C2-2-R; MINECO/FEDER). El proyecto se desarrolla por el Departament d'Enginyeria Química de la Escola d'Enginyeria de Barcelona-Est (EEBE), UPC, en colaboración con la Universitat de Girona.

3 Introducción

3.1 Objetivos del proyecto

El objetivo de este proyecto es la elaboración de un protocolo de fabricación de nanopartículas usando un extracto de raspo de uva. El protocolo está diseñado en base al uso de disoluciones metálicas sintéticas, pero deberá ser aplicable a las aguas ácidas de minas.

Entre los objetivos particulares encontramos:

- Estudiar las características de los extractos de raspo de uva en función de algunos parámetros de elaboración.
- Analizar la síntesis de nanopartículas a partir del control de las condiciones en que se realiza.
- Recomendar vías continuidad al trabajo realizado.

3.2 Alcance del proyecto

En este proyecto, se hace énfasis únicamente en la síntesis y caracterización de las nanopartículas. La separación, aplicaciones y gestión final no forman parte del trabajo, pero están pensadas como una continuación natural del mismo.

En las aguas de minas están presentes multitud de elementos, se han elegido como metales de trabajo el Cu, Cd y Zn, pero la mayor parte de los experimentos se realizará con el Cu.

4 La nanotecnología

4.1 ¿Qué es la nanotecnología?

La definición del *National Science and Technology Council* (EEUU) de la nanotecnología dice que “La esencia de la nanotecnología es su habilidad para trabajar a escala molecular, átomo a átomo, para crear estructuras mayores con nuevas organizaciones moleculares. ... el comportamiento de las características estructurales en el rango de alrededor de $10^{-9} m$ a $10^{-7} m$... exhibe cambios importantes” (Downey et al., 2000). Esta definición involucra conceptos relacionados con el tamaño y el comportamiento del material, y con el control de su síntesis.

En relación con el tamaño del material, Ramsden define la nanotecnología como la tecnología aplicada a materiales cuyas magnitudes caen dentro de la nanoescala, es decir, entre 1 nm y 100 nm (Ramsden, 2011).

El comportamiento de los materiales experimenta cambios dramáticos si el tamaño del material cae por debajo de los 100 nm (Merlijn van Spengen et al., 2010). Las propiedades ópticas, eléctricas, térmicas, mecánicas, etc., pueden verse afectadas (Hart, 2009).

Como en otras tecnologías, se espera un uso práctico, así que, para incrementar la utilidad de estos materiales, se requiere cierto nivel de control en su producción (Ramsden, 2011).

4.2 Tipos de nanoestructuras

Los nanomateriales pueden ser clasificados en cuatro categorías de acuerdo a su dimensionalidad (Fig. 1): los puntos cuánticos (0D en la macroescala) son materiales cuyas tres dimensiones pertenecen a la nanoescala, los hilos cuánticos (1D en la macroescala) tiene dos de sus tres dimensiones en la nanoescala, los pozos cuánticos (2D) solamente tiene una dimensión en la nanoescala, y finalmente, los macromateriales (3D) no tienen ninguna dimensión en la nanoescala (Murty, Shankar, Raj, Rath, & Murday, 2013).

Ejemplos de estructuras interesantes son:

- **Nanohilos y Nanotubos (1D):** Estructuras cilíndricas, se diferencian en que los nanotubos son huecos y los nanohilos macizos.
- **Nanopartículas (0D, menores que 100 nm):** Uniones de hasta 10^6 átomos; lo que realmente genera interés y les confiere propiedades únicas es que su tamaño es menor que las longitudes críticas de muchos fenómenos físicos (Poole & Owens, 2003).

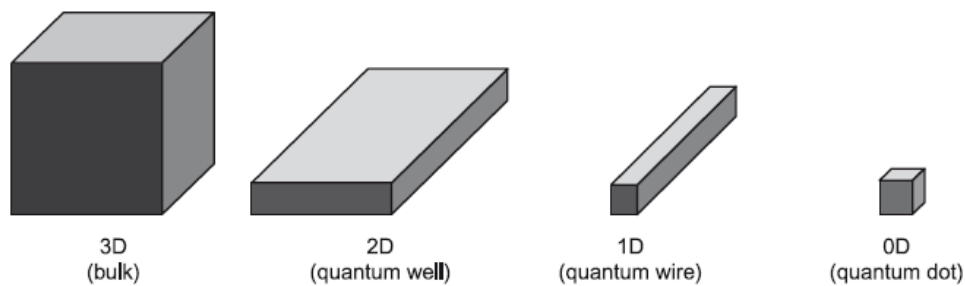


Fig. 1. Tipos de nanoestructuras. (Murty et al., 2013)

4.3 Propiedades y aplicaciones de las nanopartículas

Las nanopartículas presentan frecuentemente propiedades físicas y químicas que no se encuentran presentes en el mismo material a escala macroscópica. Los cambios más importantes se dan en las propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas, térmicas, magnéticas, etc. (Merlijn van Spengen et al., 2010; Murty et al., 2013; Poole & Owens, 2003; Ramsden, 2011).

Sus aplicaciones se encuentran en campos tan diferentes como la electrónica y la medicina, o la mejora de procesos químicos y la remediación de aguas y suelos (Murty et al., 2013; Poole & Owens, 2003).

Las nanopartículas de oro, por ejemplo, han suscitado interés en los últimos años por su utilización potencial en sensores, o en la medicina, debido a sus propiedades catalíticas, eléctricas, y ópticas (Vilela, González, & Escarpa, 2011).

4.4 Síntesis de nanopartículas

Existen dos estrategias en la síntesis de nanopartículas en función de los procesos químicos y físicos involucrados: la estrategia *top-down* y la estrategia *bottom-up* (Murty et al., 2013).

- **Top-down:** Se parte de macromateriales, usualmente sólidos, los cuales se van rompiendo por procesos químicos, físicos o térmicos hasta lograr nanomateriales. Es decir, se va de lo grande a lo pequeño. Son ejemplo, la fotolitografía, la nanolitografía, la nanoimpresión, etc.
- **Bottom-up:** Partiendo de átomos, o moléculas se consiguen nanomateriales más grandes. Es decir, se va de lo muy pequeño a lo pequeño. Son ejemplo: el autoensamblaje, la síntesis química, la microemulsión, el método sol-gel, etc.

El proceso seguido en este trabajo sigue la estrategia *bottom-up*. Se trata de una reacción química de oxidación-reducción (Mittal, Chisti, & Banerjee, 2013).

Varios métodos han sido usados en la síntesis de nanopartículas metálicas, estos incluían usualmente un exceso de citrato de sodio o de NaBH_4 como reductores. Posteriormente, se reportó la posibilidad de usar compuestos menos tóxicos como la glucosa y la fructosa en la síntesis de nanopartículas de Ag, Au, Pd y Cu (Panigrahi, Kundu, Ghosh, Nath, & Pal, 2004), o la sacarosa y la maltosa (Filippo, Serra, Buccolieri, & Manno, 2010).

Las tendencias recientes dirigen la investigación hacia vías tanto menos tóxicas, como baratas; principalmente, el uso de alimentos como vinos, frutas té y mieles en la síntesis de nanopartículas (Vilela et al., 2011).

Actualmente ya se explora no solamente el uso de sustancias poco tóxicas y baratas, sino también la revalorización de residuos como el raspo de uva (Gerits, 2016), el bagazo de uva (Baruwati & Varma, 2009), la piel de los plátanos (Bankar, Joshi, Kumar, & Zinjarde, 2010) y las hojas de diferentes árboles (Machado et al., 2013; Machado, Pacheco, Nouws, Albergaria, & Delerue-Matos, 2015).

4.4.1 Mecanismo de síntesis y formación de nanopartículas

La formación de nanopartículas se origina por la reducción de un ión metálico en disolución. Los elementos más importantes que intervienen en ella son 1) el medio donde se produce la reacción, 2) el agente reductor, y 3) el agente estabilizante (Xiong, Wang, Xue, & Wu, 2011).

- **Medio de reacción:** El medio puede condicionar el comportamiento tanto del reductor como la capacidad del estabilizante; frecuentemente el medio es el agua.
- **Agente reductor:** Sustancia capaz de suministrar electrones al catión metálico.
- **Estabilizante:** La misión del estabilizante es evitar la aglomeración o un crecimiento incontrolado de las nanopartículas que lleve a su precipitación.

Estos tres elementos pueden ser proporcionados simultáneamente por extractos de origen vegetal. El agua usada para la extracción proporciona el medio (Gross, 2015); los azúcares, polifenoles, terpenos, alcaloides, ácidos fenólicos, vitaminas y proteínas de la planta actúan como reductores en la formación de nanopartículas, y posteriormente, como estabilizantes (Kharissova, Dias, Kharisov, Pérez, & Pérez, 2013; Makarov et al., 2014).

El mecanismo de formación de nanopartículas metálicas se explica en tres fases: 1) fase de activación, 2) fase de crecimiento, y 3) fase de estabilización (Makarov et al., 2014).

- **Fase de activación:** comprende la reducción del metal, y la nucleación (Fig. 2). La nucleación es energéticamente menos favorable que el crecimiento, aumentar la temperatura en esta fase incrementa el ratio de nucleación (Makarov et al., 2014).



Fig. 2. Fase de activación.

- **Fase de crecimiento:** los metales cerivalentes cercanos van juntándose entre sí para formar estructuras más grandes (Fig. 3). Siguen produciéndose reacciones de reducción de aniones metálicos, hay nucleaciones heterogéneas y crecimiento por un fenómeno conocido como maduración de Ostwald (Makarov et al., 2014).



Fig. 3. Fase de crecimiento.

- **Estabilización:** las nanopartículas adquieren el tamaño y forma energéticamente más favorables (Fig. 4). Este punto es gobernado por la capacidad de estabilización de los compuestos presentes en cada planta (Makarov et al., 2014).

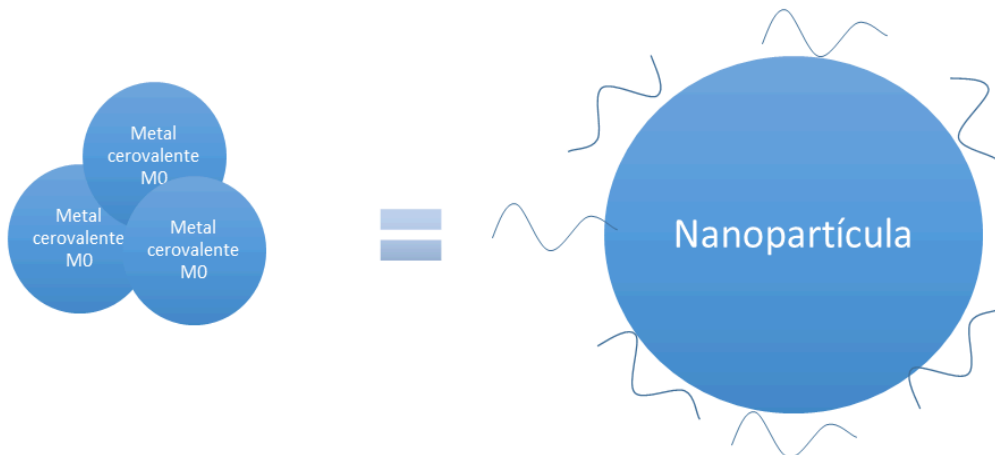


Fig. 4. Fase de estabilización.

4.4.2 Parámetros de control de la reacción

Las características más significativas de las nanopartículas son su tamaño y su forma (Ramsden, 2011). El control de estas dos es un gran reto debido a la variación de los

compuestos reductores y la dificultad de la reproducibilidad (Paulino Silva, Garcez Reis, & Caetano Bonatto, 2015). Así, una alternativa más simple es su control indirecto mediante la modificación de otros parámetros como:

- **Temperatura de síntesis:** El aumento de la temperatura de síntesis aumenta el ratio de nucleación (Makarov et al., 2014), ello origina que las nanopartículas sean generalmente más pequeñas, ya que todos los núcleos consumen iones metálicos al mismo tiempo (Caroling, Nithya Priyadharshini, Vinodhini, Mercy Ranjitham, & Shanthi, 2015).
- **Tiempo de reacción:** El tiempo de reacción es otro factor a considerar en la síntesis de nanopartículas. Interviene en mayor medida en el tamaño de nanopartícula que se logra, ya que parando la reacción o alterando sus condiciones se puede evitar acabar la fase de crecimiento en las condiciones iniciales. Los cambios de color y la medición del espectro UV-Vis pueden indicar indirectamente el crecimiento de las nanopartículas (M. Awwad, M. Salem, & O. Abdeen, 2013).
- **Concentración:** Si la concentración de catión metálico está por encima de una concentración crítica, la nucleación está favorecida (Mehranpour, Askari, Ghamsari, & State, 2012). Una nucleación favorecida causa una disminución en el tamaño medio de las nanopartículas y un aumento en su número.
- **pH:** Los cambios del pH modifican el contenido de fitoquímicos de los extractos vegetales, y por consiguiente su capacidad para reducir y estabilizar nanopartículas (Makarov et al., 2014).
- **Potencial electroquímico:** El potencial electroquímico del ion condiciona la efectividad de la síntesis de las nanopartículas (Makarov et al., 2014). El extracto, dependiendo de su composición, tendrá más o menos facilidad para reducir los cationes metálicos.
- **Alteraciones del mecanismo:** El crecimiento mediante semillas o pequeñas nanopartículas usadas a modo de núcleos es a menudo usado para controlar mejor tamaño y forma de las nanopartículas finales. Así se puede conseguir estructuras más complejas (Aherne, Cara, Kelly, & Gun'Ko, 2010; Al-Kazazz, Al-Imarah, Al-Hasnawi, Agelmashotjafar, & Abdul-Majeed, 2013).

No todos estos factores tienen siempre la misma importancia. Dependiendo de los reductores y el metal a reducir, la alteración de un factor resultará en cambios más pronunciados que la modificación de otro. Por ejemplo, el pH y la temperatura tienen mucha relevancia en el tamaño de nanopartículas de plata, mientras que en las de oro, prevalecen la temperatura y el medio surfactante (Rao & Paria, 2015).

4.5 La química verde

La química verde es un nuevo concepto de cómo se debe entender la química y la ingeniería química. Aplicando ciertos principios tanto al diseño, desarrollo, e implementación

de productos y procesos químicos, se busca obtener beneficios económicos y ambientales (American Chemical Society ACS, n.d.-b).

En el libro *Green Chemistry: Theory and Practise*, Paul T. Anastas y John C. Warner elaboraron una lista de 12 principios en los que se basa la química verde. Entre estos principios encontramos la prevención, la eficiencia en el uso de recursos, la seguridad, la eficiencia energética, la prevención de accidentes, la prevención de la contaminación, etc. (American Chemical Society ACS, n.d.-a).

La nanotecnología verde aplica los mismos principio que la química verde. Se hace énfasis especialmente en la elección del medio de disolución, el impacto ambiental del agente reductor y la toxicidad del estabilizante (Raveendran, Fu, & Wallen, 2003).

Los extractos de plantas que contienen compuestos como los polifenoles actúan reduciendo metales y estabilizando las nanopartículas metálicas; además de que los residuos que generan son relativamente inocuos y fáciles de tratar (Kharissova et al., 2013).

También se ha investigado el uso de partes de plantas o plantas enteras como bioreactores (Kharissova et al., 2013; Makarov et al., 2014), y el uso de microorganismos (Castro, Blázquez, González, Muñoz, & Ballester, 2010; Kharissova et al., 2013; Quester, Avalos-Borja, & Castro-Longoria, 2013; Zhang, Yan, Tyagi, & Surampalli, 2011). La gran variabilidad de condiciones en el uso de plantas o partes de plantas como bioreactores (Makarov et al., 2014), o la posible peligrosidad en la disposición de residuos (Kharissova et al., 2013) y los tiempos de reacción junto con la estabilidad (Iravani, 2011) en la síntesis por microorganismos limitan estas vías.

En general, el uso de extractos vegetales es una vía más rápida y estable que el empleo de vegetales en sí, donde procesos de difusión gobiernan la cinética de la reacción; o que el empleo de organismos vivos donde constantemente se producen reacciones que modifican el medio, el reductor y el estabilizante (Iravani, 2011; Makarov et al., 2014).

Si bien la variabilidad que puede sufrir un extracto es baja, su composición aún puede verse afectada por factores atmosféricos, biológicos y el simple paso del tiempo.

Los extractos, al igual que las otras vías verdes, se enfrentan a retos comunes como son la reproducibilidad, la escalabilidad y la predicción de los resultados.

- **Reproducibilidad:** La forma y el tamaño de las nanopartículas obtenidas puede variar enormemente en función de la parte de la planta de la cual se obtiene el extracto; inclusive usando la misma parte de la misma planta, hay variaciones en

función de la época del año, el agua disponible, o el estrés sufrido por la planta (Paulino Silva et al., 2015).

- **Escalabilidad:** Los problemas a resolver son 1) la implementación de métodos altamente reproducibles para la obtención de la materia vegetal y la preparación del extracto **a gran escala**, y 2) la variabilidad de formas y tamaños de nanopartículas sintetizadas en condiciones idénticas salvo el volumen del reactor (Paulino Silva et al., 2015).
- **Predicción de resultados:** Las tendencias actuales se encaminan hacia la obtención de modelos matemáticos que puedan ser implementados en herramientas informáticas. De esta manera, conociendo los factores que afectan la reacción, se pueden prever las condiciones para obtener nanopartículas monodispersas y estables (Paulino Silva et al., 2015).

5 Técnicas de caracterización de nanopartículas

5.1 Espectroscopia UV-Vis

En la espectroscopia UV-Vis se cuantifica la cantidad de luz extinguida (Absorción + dispersión) que produce una muestra. Se mide la intensidad de un haz de luz antes y después de pasar a través de una muestra. Se repite el proceso para cada longitud de onda, creando así un espectro de extinción (nano Composix, 2012). Este espectro es típicamente comparado con el espectro de un blanco de referencia (Ocean Optics, 2015) (Fig. 5).

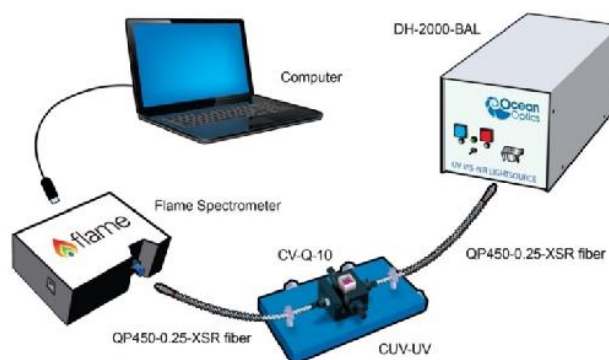


Fig. 5. Montaje del espectrómetro Flame-S para medir la absorbancia. (Ocean Optics, 2015)

Algunas nanopartículas metálicas presentan plasmones de resonancia superficiales, fenómeno que puede ser observado mediante la espectroscopia UV-Vis. A una frecuencia determinada las nanopartículas interactúan con la luz incidente, produciéndose la resonancia colectiva de los electrones conductores superficiales de las nanopartículas y la dispersión de la luz incidente (Moores & Goettmann, 2006). Este fenómeno es también conocido como dispersión de Mie (Moores & Goettmann, 2006).

La posición, forma e intensidad del espectro UV-Vis del plasmón de resonancia depende de 1) la constante dieléctrica del medio, 2) interacciones electrónicas de los estabilizantes, y 3) la nanopartícula en sí: forma, tamaño y monodispersión (Moores & Goettmann, 2006).

El ancho de banda del plasmón aumenta con la disminución del tamaño de la nanopartícula (Link & El-Sayed, 1999) ya que el efecto de dispersión queda potenciado (Dang, Le, Fribourg-Blanc, & Dang, 2011). De igual forma, se ha observado un desplazamiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda más cortas con la disminución del tamaño de las nanopartículas (Moores & Goettmann, 2006).

Si el tamaño de las nanopartículas es muy pequeño, su comportamiento se ve fuertemente alterado. De acuerdo con la teoría de Mie, cuando el radio de las nanopartículas está entre 2 nm y 10 nm, los espectros que exhiben son independientes del tamaño de las nanopartículas (Varshney, Bhadauria, Gaur, & Pasricha, 2010).

Xiong, et al. observaron en la síntesis de nanopartículas de cobre con ácido ascórbico que si su diámetro es inferior a 4 nm, se pierde el plasmón característico (Xiong et al., 2011). A dimensiones tan pequeñas, los efectos cuánticos se vuelven más importantes y deja de observarse el plasmón de resonancia (Moores & Goettmann, 2006).

5.2 Microscopio electrónico de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido o SEM usa un haz de electrones en lugar de luz para generar imagen magnificada (Western Washington University, 2014). En el SEM, a diferencia del TEM, los electrones que forman la imagen son los reflejados. Por esta razón, se pueden analizar muestras relativamente gruesas sin el peligro de esparcimiento o absorción (Egerton, 2005).

El SEM opera en vacío para aumentar la resolución así se evita interferencias del aire. Otro factor que afecta la resolución es la velocidad de escaneo de la superficie, cuanto más rápida, menos resolución. Es necesario que las muestra tengan conductividad eléctrica en su superficie para poder visualizarse (Hart, 2009).

A partir del SEM se obtiene básicamente tres tipos de información, 1) topografía, o características superficiales de la muestra, 2) morfología, o formas, tamaños y distribuciones, y finalmente 3) composición, en forma de ratios y áreas (Murty et al., 2013).

Las etapas del funcionamiento del SEM se muestran en la Fig. 6 y son las siguientes: A) generación de electrones, B) emisión y aceleración del haz de electrones, C-E) direccionamiento y concentración del haz de electrones, F) interacción del haz con la muestra, G) detección de electrones reflejados, y H) interpretación de resultados (Western Washington University, 2014).

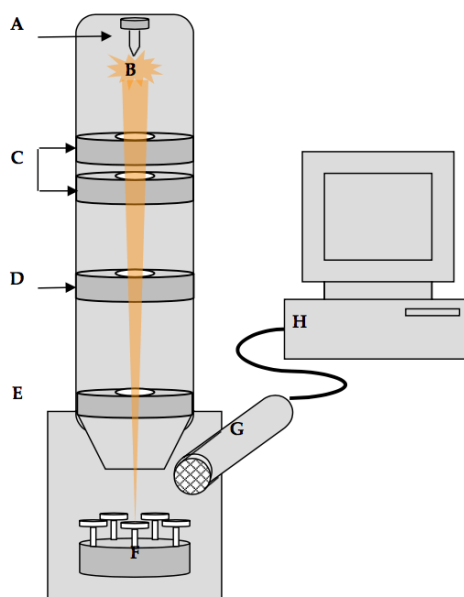


Fig. 6. Esquema de funcionamiento del SEM. (Western Washington University, 2014)

5.3 EDX o EDS

El EDX o EDS es una técnica analítica usada para el análisis elemental o la caracterización química; en la Fig. 7 se muestra un espectro obtenido por esta técnica. Se basa en el análisis de Rayos-X emitidos por una muestra como consecuencia de ser bombardeada con partículas cargadas (Cantoni, 2010).

Cuando se dirige un haz de electrones, protones, o Rayos X hacia un átomo, alguno de sus electrones interiores puede ser expulsado de su orbital correspondiente. Los electrones exteriores tenderán a ocupar los huecos producidos y liberarán energía en el proceso; la energía liberada es característica de cada elemento y permite su identificación (Wikipedia, n.d.) (Fig. 8).

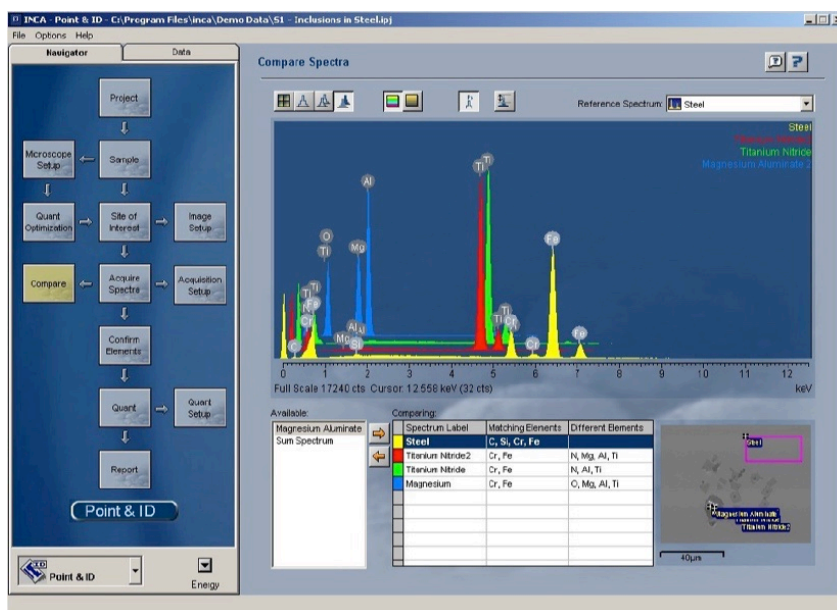


Fig. 7. Ejemplo de espectro obtenido por EDX.(Oxford Instruments Analytical, 2006)

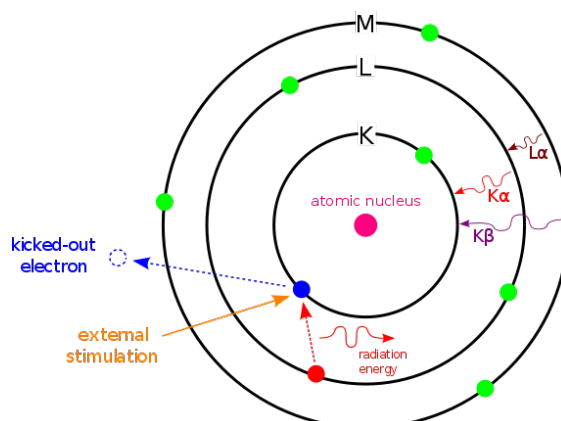


Fig. 8. Esquema del proceso EDX. (Wikipedia, n.d.)

6 Preparación y caracterización del extracto

Anteriormente se describió el proceso de formación de nanopartículas metálicas como una reacción *redox*, en la cual intervienen cationes metálicos que actúan de oxidantes, y extractos vegetales como reductores.

En este apartado, se especifica el procedimiento de obtención de estos extractos vegetales reductores. Para ello, porciones de raspo de uva triturado se sometieron a una extracción con reflujo a 100° C durante 30 min. Los parámetros estudiados en la elaboración del extracto fueron las partes del raspo: raquis y pedicelos; y el tamaño de cada fracción.

6.1 Adecuación del raspo de uva

El objetivo de la adecuación del raspo de uva es obtener porciones de raspo lo más homogéneas posible, eliminando impurezas y suciedad.

Restos de raspo de uva con origen en Subirats, Alt Penedès, Barcelona, fueron tratados con el fin de elaborar un extracto con propiedades reductoras. Los seis pasos seguidos en su tratamiento son descritos a continuación:

- a) **Separación del raquis y los pedicelos** (Fig. 9), así como de cualquier otro residuo que se pueda encontrar. De esta manera se incrementó la homogeneidad de las fracciones, y se permitió al mismo tiempo, el estudio del contenido en polifenoles y azúcares reductores de cada parte.



Fig. 9. Raspo de uva, compuesto por el raquis (tallo leñoso que estructura el racimo) y los pedicelos (parte en contacto con los frutos).

- b) **Lavado con agua destilada** para eliminar impurezas y otros contaminantes. El protocolo de lavado fue el siguiente:
- Lavado agitando con agua destilada durante 3 minutos y dejar reposando durante 6 minutos. Cambiar el agua usada. Pedicelos y raquis se lavan por separado.
 - Lavado agitando con agua destilada durante 2 minutos y dejar reposando durante 4 minutos. Cambiar el agua.
 - Lavado agitando con agua destilada durante 1 minuto y dejar reposando durante 2 minutos. Dejar secar durante 24 horas a temperatura ambiente en una atmósfera libre de polvo.
- c) **Lavado de ultrasonidos** para eliminar impurezas incrustadas. El raspo se cortó en elementos de entre 7 cm–10 cm, para que fueran más fácilmente sumergibles. El aparato fue utilizado durante 5 minutos a máxima potencia. Se usó recipientes de vidrio para una mejor transmisión de las ondas mecánicas.
- d) **Secado en estufa durante 24 horas** (Fig. 10), la temperatura empleada fue de 110° C. Se cubrió el fondo de la estufa con papel para evitar dejar material una vez acabado el proceso y se repartió el raspo lo más uniformemente posible en la superficie.



Fig. 10. Secado del raspo de uvas en la estufa.

- e) **Triturado** (Fig. 11). Se cortó el raspo de uva en trozos de 1 cm o 2 cm para facilitar el triturado. Se colocaron en lotes de 20 g y así se evitó saturar el molino. Finalmente se trituró durante 3 minutos.



Fig. 11. Triturado del raspo de uva. a) y b) Triturado del raquis, los tallos grandes (a) fueron cortados (b) antes de proseguir; c) y d) triturado de los pedicelos.

- f) **Tamizado** (Fig. 12). Se seleccionaron los tamices de 0,90 mm y 0,25 mm y se tamizaron lotes de 40 g durante 10 minutos.



Fig. 12. Tamizado del raspo de uva para separarlo en 3 fracciones.

6.2 Preparación del extracto de raspo de uva

A partir del raspo de uva limpiado, triturado y tamizado, se preparó el extracto. La función de este extracto es doble ya que se comporta tanto como agente reductor, al mismo tiempo que sirve de agente estabilizante (Rai, Yadav, & Gade, 2009), evitando así el crecimiento de las partículas metálicas más allá de la nanoescala.

Se sabe que para el raspo de uva y vegetales análogos, la capacidad reductora del extracto varía con parámetros como la Temperatura de extracción (T_e), el tiempo de extracción (t_e) y proporción en masa entre la materia vegetal y el disolvente w/w (Gerits, 2016; Machado et al., 2013; Mystrioti, Xanthopoulou, Tsakiridis, Papassiopi, & Xenidis, 2016).

En este trabajo se estudiaron por separado el raquis y los pedicelos del raspo de uva, y también, se trabajó con el tamaño de las fracciones trituradas. La temperatura de extracción (T_e) utilizada fue de 100° C, el tiempo de extracción $t_e = 30$ min y la proporción en masa entre el raspo de uva y el agua usada de 3:100 (w/w).

Se buscó la maximización de la cantidad de polifenoles a partir de los factores estudiados (raquis/pedicelos y tamaño de la fracción). Para facilitar el seguimiento, se asignó un identificador alfanumérico a cada extracto. Por ejemplo se tiene: A 1.2 o B 2.3 donde la primera posición (A/B) identifica la **parte del raspo** utilizada, la segunda posición (1/2/3) el **tamaño de la fracción**, y finalmente, la tercera (1/2/3) el número de réplica.

En resumen (Tabla 1):

- a) Estudio del efecto de la **parte del raspo** utilizado: Pedicelos→A , y Raquis→B.
- b) Estudio del efecto del **tamaño de la fracción** estudiada: Fracciones Grandes ($\Phi > 0,90$ mm)→1, Fracciones Intermedias ($0,25 \text{ mm} < \Phi < 0,90$ mm)→2, y Fracciones Finas ($\Phi < 0,25$ mm)→3.

La caracterización del extracto fue llevada a cabo mediante la medición de tres parámetros: 1) la cantidad total de polifenoles presentes en cada uno de los extractos preparados, valorados a partir del método Folin-Ciocalteu, 2) la cantidad total de azúcares reductores (glucosa y fructosa), valorados usando el método de Rebelein, y 3) el pH.

Parte	Tamaño de la fracción	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
A (pedicelos)	1 ($\Phi > 0,90$ mm)	1 (3,000 g)	2 (3,000 g)	3 (3,000 g)
	2 ($0,25 \text{ mm} < \Phi < 0,90$ mm)	1 (3,000 g)	2 (3,000 g)	3 (3,000 g)

	3 ($\Phi < 0,25$ mm)	1 (3,000 g)	2 (3,001 g)	3 (3,000 g)
B (raquis)	1 ($\Phi > 0,90$ mm)	1 (3,000 g)	2 (3,000 g)	3 (3,000 g)
	2 ($0,25$ mm $< \Phi < 0,90$ mm)	1 (3,000 g)	2 (3,000 g)	3 (3,000 g)
	3 ($\Phi < 0,25$ mm)	1 (3,000 g)	2 (3,000 g)	3 (3,000 g)

Tabla 1. Extracciones realizadas. En total se realizaron 18 extracciones individuales, agrupadas en 6 familias distintas. Las masas de raspo utilizadas, con una tolerancia de $\pm 0,001$ g, se encuentran entre paréntesis.

6.2.1 Materiales, reactivos e instrumentos

- 3 g de raspo de uva tratado.
- 100 ml de agua ultrapura.
- Matraz aforado 100 ml.
- Matraz esférico para reflujo de 500 ml.
- Columna de reflujo Liebig-West de 40 cm (longitud útil).
- Manta calefactora para matraces esféricos de 500 ml.
- Vaselina para las juntas esmeriladas.
- Papel de celulosa.
- Papel de filtro cualitativo Whatman.
- Bomba de vacío.
- Matraz Kitasato.
- Embudo Büchner.
- Centrífuga Centronic BL-II SELECTA.
- Jeringa de plástico estéril de 20 ml.
- Filtro de jeringa RC Agilent Captiva 0,2 μ m.

6.2.2 Extracción por reflujo

Para la preparación del extracto, se cogieron 3 g de raspo de uva y se colocaron en el matraz esférico para reflujo de 500 ml. Se añadió el agua ultrapura medida con un matraz aforado de 100 ml. Finalmente, se acabó el montaje para llevar a cabo el reflujo (Fig. 13).

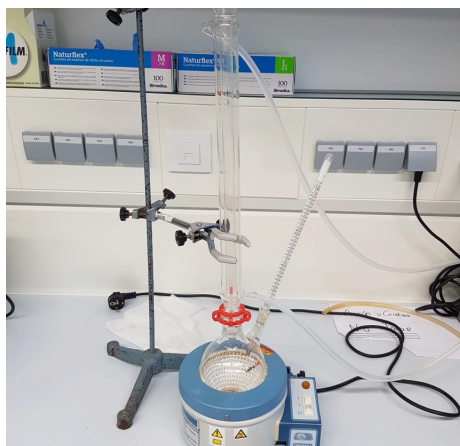


Fig. 13 Montaje final de la extracción por reflujo.

Luego, se activó la refrigeración por agua y se encendió la manta. El tiempo de extracción utilizado fue de 30 minutos, empezándose a contar a partir del momento de ebullición. Transcurridos los 30 minutos, se apagó la manta calefactora y se esperó 10 minutos antes de cerrar la corriente de refrigeración, para evitar pérdidas de vapor.

6.2.3 Filtrado por gravedad

Inmediatamente después, se procedió con un filtrado con papel de celulosa (Fig. 14). Para uniformizar el proceso, este filtrado tuvo una duración de 30 min independientemente del extracto elaborado. Es importante tratar de recuperar todo el material posible de dentro del matraz esférico para no perder extracto. No obstante, la materia vegetal puede llegar a colmatar el filtro, en este caso es recomendable usar un doble filtro, el primero de los cuales se retirará cuando el caudal de filtrado disminuya sensiblemente.



Fig. 14 Primer filtrado del extracto, 10 min después de apagar la manta calefactora. La bomba de vacío está apagada.

6.2.4 Filtrado al vacío

A continuación, el extracto fue sometido a otro filtrado. Esta vez se filtró al vacío con un matraz Kitasato y un embudo Büchner, usando el papel de filtro Whatman. Este filtrado duró menos de 1 minuto por extracto elaborado.

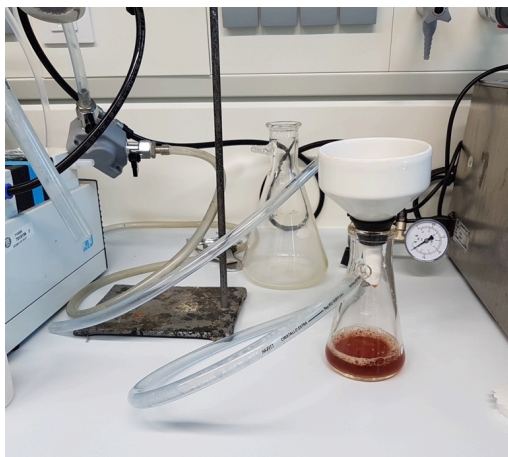


Fig. 15. Filtrado al vacío.

6.2.5 Centrifugado y filtrado 0,2 μm

El extracto anterior fue centrifugado a una velocidad de 900 rpm durante 5 min. Se recogió el sobrenadante, que fue posteriormente filtrado usando un filtro de jeringa RC Agilent. Finalmente, el extracto fue etiquetado y congelado hasta su uso.

6.3 Cuantificación de polifenoles

La cuantificación de polifenoles se llevó a cabo con el reactivo Follin-Ciocalteu, siguiendo el método de equivalentes de ácido gálico (GAE). Con este método, se determina colorimétricamente la cantidad de compuestos reductores en mg/l de ácido gálico equivalentes; en la Fig. 16 se observa los diferentes patrones. El método usado fue adaptado de (Gerits, 2016; Pujol et al., 2013).

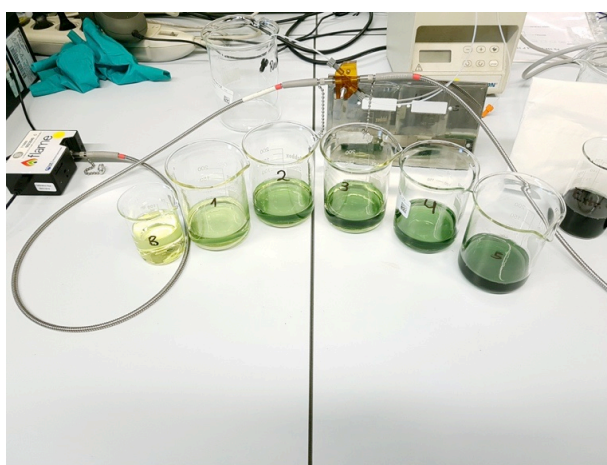


Fig. 16. Patrones de ácido gálico para obtener la recta de calibrado mediante espectrofotometría UV-Vis.

6.3.1 Materiales, reactivos e instrumentos

- Ácido gálico (titration) SIGMA.
- Reactivo Folin-Ciocalteu (titration) PanReac.
- Carbonato de sodio anhidro (ACS) Merck.
- Agua ultrapura.
- Matraces aforados de 10 ml, 25 ml, 50 ml.
- Espectrofotómetro Hewlett Packard 8453.

6.3.2 Procedimientos

En primer lugar, se disolvieron 0,1 g de ácido gálico en un matraz aforado de 50 ml, a partir de esta disolución se prepararon, en matraces de 10 ml, los patrones de ácido gálico: 800, 1000, 1200, 1400 y 1800 mg/L. Se disolvieron 5 g de carbonato de sodio en 50 ml de agua.

Se colocaron 0,2 ml de patrones o muestras de extracto en matraces de 10 ml, se añadieron 4 ml de agua ultrapura y 1,2 ml del reactivo Folin-Ciocalteu. Se esperó 5 minutos, y se añadieron 1,8 ml de la disolución de carbonato de sodio. Finalmente, se enrasó con agua ultrapura hasta los 10 ml y se dejaron reposar 2 horas antes de su análisis. De este paso se obtuvieron muestras y patrones diluidos en matraz: Dilución Matraz en Tabla 2.

Mediante el espectrofotómetro, se realizó un espectro UV-Vis y se determinó que el punto de absorbancia máxima estaba a 779 nm; se fijó esa longitud de onda para el análisis. Los patrones diluidos en matraz se tuvieron que diluir nuevamente en agua ultrapura por su elevada absorbancia (Absorbancia > 2). Esta última dilución fue de 1:5 %V/V_{total} : Dilución Análisis en Tabla 2.

A partir de las absorbancias medidas (Tabla 2), se calculó la recta de regresión ().

Recta de regresión: $0,1177 \cdot X + 0,05368$		Longitud de onda: 779 nm	
Concentración Inicial Muestra (mg/L ácido gálico)	Dilución Matraz (mg/L)	Dilución Análisis 1:5 V/V (mg/L)	Absorbancia
800	16	3,2	0,42852
1000	20	4	0,53262
1200	24	4,8	0,61705
1400	28	5,6	0,70240
1800	36	7,2	0,90590

Tabla 2. Absorbancias obtenidas de los espectros de los patrones de ácido gálico a una longitud de onda de 779 nm.

En Tabla 2, la primera columna hace referencia a la concentración de patrones preparada con ácido gálico (volumen 0,2 ml). La columna de Dilución Matraz señala la concentración de ácido gálico resultante en cada matraz aforado de 10 ml. La tercera columna, Dilución Análisis, indica el contenido real en ácido gálico de cada patrón analizada, es decir, después de ser disuelta en 4 volúmenes idénticos de agua ultrapura.

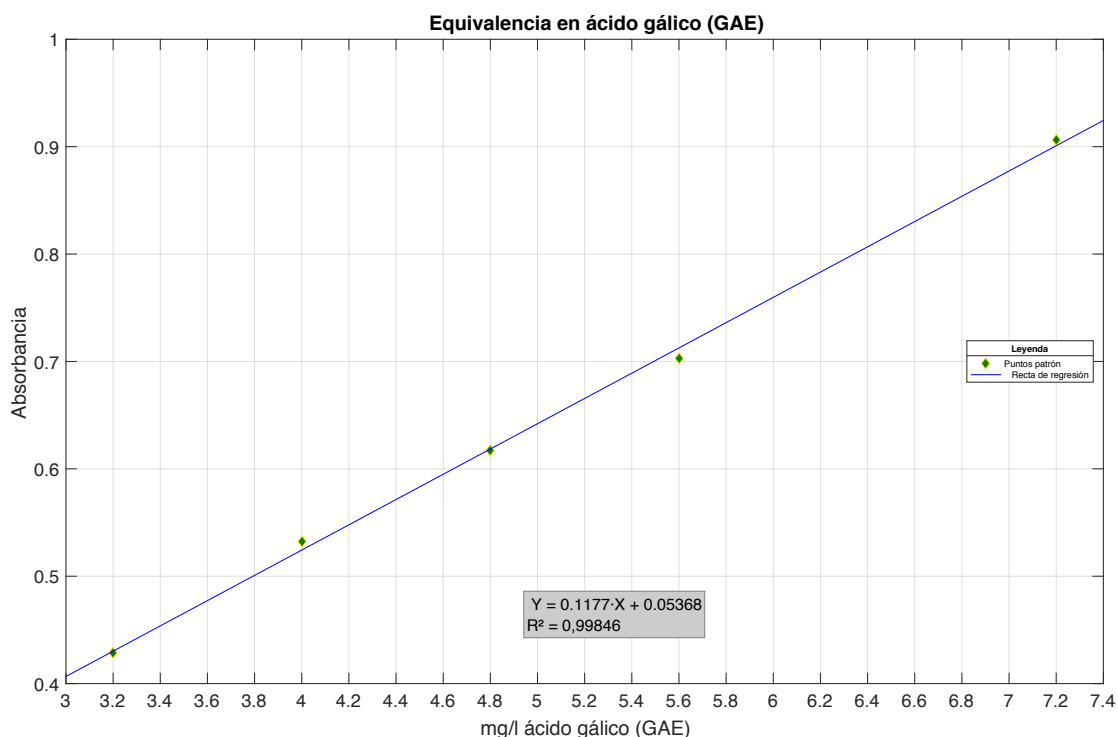


Fig. 17. Recta de calibrado que relaciona la absorbancia de una muestra y su contenido real en polifenoles (equivalentes en ácido gálico).

Las muestras de extracto se elaboraron de manera similar, simplemente se substituyeron los 0,2 ml de patrón por 0,2 ml del respectivo extracto en el matraz de 10 ml (d. Matraz en Ecuación 1). Los tiempos de reposo y productos añadidos fueron los mismos.

Las muestras diluidas en matraz se tuvieron que diluir nuevamente en agua ultrapura por su elevada absorbancia (Absorbancia > 2). Esta última dilución fue de 1:2 V/V_{total} (d. Análisis en Ecuación 1).

A partir de la absorbancia de cada extracto (Tabla 3), se calculó la concentración de ácido gálico equivalente que tenía el extracto. Para ello se usó la expresión:

$$GAE \left(\frac{mg \text{ ácd. gálico}}{L} \right) = \frac{(Absorbancia - 0,05368)}{0,1177} \left(\frac{mg \text{ ácd. gálico}}{L \text{ d. Análisis}} \right) \cdot \frac{2 \text{ ml d. Análisis}}{1 \text{ ml d. Matraz}} \cdot \frac{10 \text{ ml d. Matraz}}{0,2 \text{ ml d. Inicial Muestra}}$$

Ecuación 1. Contenido GAE de los extractos a partir de la absorbancia.

En la siguiente tabla se reflejan los valores de equivalentes en ácido gálico de cada muestra:

Extracto	Réplica	Absorbancia	GAE (mg/L)	Extracto	Réplica	Absorbancia	GAE (mg/L)
A.1	1	0,6863	506,016	B.1	1	0,6026	439,016
	2	0,7164	530,088		2	0,5874	426,904
	3	0,7660	569,800		3	0,4642	328,296
A.2	1	0,9764	738,120	B.2	1	0,8235	615,784
	2	0,8463	633,992		2	0,7765	578,136
	3	0,7187	531,936		3	0,7939	592,088
A.3	1	0,7720	574,592	B.3	1	0,7127	527,152
	2	0,7735	575,760		2	0,7982	595,528
	3	0,9011	677,864		3	0,8061	601,888

Tabla 3. Contenido en polifenoles de cada extracto, como mg/l de ácido gálico, obtenido a partir de la recta de calibración y las desdiluciones correspondientes.

6.4 Cuantificación de azúcares reductores

Tradicionalmente se han usado varios métodos en la determinación de azúcares, entre los cuales encontramos 1) la oxidación de la glucosa con iodo, 2) la oxidación de la fructosa con la solución de Nyns, y 3) estudios del poder reductor combinado (Morris & Wesp, 1932).

La aproximación seguida en este trabajo, que se basa en el método de Rebelein, pertenece a esta tercera categoría. El método de Rebelein es una valoración por retroceso, donde el poder reductor de la glucosa y la fructosa es usado sobre el reactivo de Fehling (Russo, 2011).

El proceso que tiene lugar es el siguiente:

- La glucosa y la fructosa muestran estructuras cíclicas y lineales, las cuales están en equilibrio en disoluciones acuosas (Fig. 18).

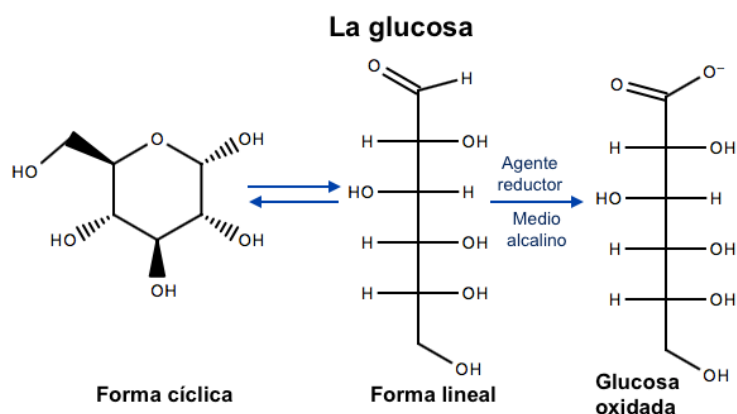
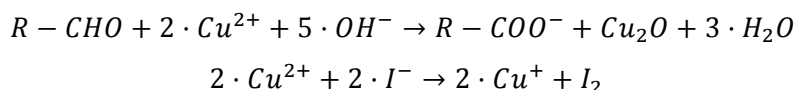
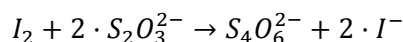


Fig. 18. Formas de la glucosa en disolución.

- El reactivo de Fehling es una disolución alcalina que contiene Cu^{2+} , cuya función es ser reducido por los azúcares reductores— se produce una oxidación del grupo aldehído del azúcar (Clark, 2004)—, o por el yoduro.



- El yodo producido por la oxidación del yoduro es reducido por el tiosulfato a yoduro nuevamente. La cantidad de tiosulfato necesaria para llegar al punto final de la valoración revela el contenido de azúcares reductores.



- El punto final se encuentra gracias al almidón, en él la disolución pasa de un azul grisáceo a un blanco cremoso. La concentración de azúcares reductores RS es proporcional a la diferencia entre el tiosulfato usado en la valoración del blanco V_b , y el usado en la valoración de la muestra V_s .

$$RS \left(\frac{g}{L} \right) = 2 \cdot (V_b - V_s)$$

Ecuación 2. Cálculo de los azúcares reductores.

El reactivo de Fehling es una disolución formada por la adición de 1) sulfato de cobre, y 2) tartrato de sodio y potasio + hidróxido de sodio. En medio alcalino, el Cu^{2+} del reactivo de Fehling se encuentra formando un complejo azul, que cuando se calienta oxida los azúcares reductores y precipita como Cu_2O (Blom & Rosted, 1947).

Calentar es importante para asegurar la completa oxidación de los azúcares, de otra forma, la glucosa puede reducir el yodo, que además es volátil (Cajori, 1922).

6.4.1 Materiales, reactivos e instrumentos

- Placa calefactora con agitación magnética.
- Matraces aforados 250 y 500 ml.
- Matraz Erlenmeyer 250 ml.
- Bureta 50 ml.
- Pipeta 10 ml.
- Pipeta 5 ml.
- Tartrato de sodio y potasio (ACS) PanReac.
- Hidróxido de sodio (NF) Scharlau.
- Yoduro de potasio (USP) PanReac.
- Ácido sulfúrico 98% (ACS) PanReac.
- Tiosulfato de sodio (USP) PanReac.
- Almidón (ACS) SIGMA-ALDRICH
- Sulfato de cobre II (BP) PanReac.

6.4.2 Procedimiento

El procedimiento seguido fue adaptado a partir de (Benito Sáez, 2015):

- **Disolución de ácido sulfúrico 16% (1,6 M):** Se diluyeron 21,75 ml de ácido sulfúrico al 98%, de densidad 1,84 g/ml, en agua ultrapura usando un matraz aforado de 250 ml.

$$H_2SO_4 \left(\frac{M}{V} \right) = \frac{21,75 \text{ ml} \cdot 1,84 \frac{g}{ml}}{250 \text{ ml}} \cdot 100 = 16\%$$
- **Disolución de hidróxido de sodio (5 M):** En un matraz aforado de 250 ml, se disolvieron 50 g de hidróxido de sodio en agua ultrapura.

$$[NaOH] = \frac{50 \text{ g NaOH} \cdot \frac{1 \text{ mol NaOH}}{40 \text{ g NaOH}}}{0,25 \text{ L}} = 5 \text{ M}$$
- **Disolución de sulfato de cobre (0,167 M):** En matraz aforado de 250 ml, se disolvió 6,703 g de sulfato de cobre anhidro usando agua ultrapura, luego se agregaron 0,416 ml de ácido sulfúrico 16 % y se enrasó.
- **Disolución alcalina de tartrato de sodio y potasio (Sal de Seignette) 0,886 M:** Se disolvió 62,5 g de tartrato de sodio y potasio en 100 ml de agua ultrapura, se agregó 100 ml de disolución de hidróxido de sodio 5 M, y se enrasó a 250 ml con agua ultrapura.
- **Disolución de yoduro de potasio 30% (1,807 M):** En un matraz aforado de 250 ml, se disolvieron 75 g de yoduro de potasio, se añadió 5 ml de hidróxido de sodio 5 M y se enrasó.
- **Disolución de tiosulfato de sodio 0,1102 M:** En un matraz aforado de 500, se disolvieron 13,777 g de tiosulfato de sodio pentahidratado usando agua ultrapura, se añadió 10 ml de hidróxido de sodio 5 M y se enrasó a 500 ml.
- **Disolución indicador de almidón al 1%:** Se disolvieron 2,5 g de almidón en 250 ml de agua ultrapura.
- **Preparación de las muestras y del blanco:** Cada muestra se preparó en un matraz Erlenmeyer de 100 ml, allí se vertieron 10 ml de la disolución de sulfato de cobre (1,67 M), 5 ml de la disolución alcalina de tartrato de sodio y potasio (0,886 M) y 2 ml de extracto, o de agua ultrapura en el caso del blanco.

El matraz Erlenmeyer se colocó en un baño a 94° C durante 5 minutos, a continuación se enfrió rápidamente con agua del grifo.

Se añadieron, en este orden, 10 ml de la disolución de yoduro de potasio (30%), 10 ml de ácido sulfúrico (16%) y 10 ml del almidón indicador (1%).

Se valoró con la disolución de tiosulfato. El punto final está marcado por el cambio de color de la disolución desde azul grisáceo a blanco cremoso.

La cantidad de azúcares obtenidos de cada extracto (Ecuación 2) se refleja en la siguiente tabla:

Extracto	Rép.	V _b - V _s	RS (g/L)	Extracto	Rép.	V _b - V _s	RS
A.1	1	0,9 ml	1,8 (g/L)	B.1	1	1,2 ml	2,4 (g/L)
	2	0,6 ml	1,2 (g/L)		2	1,3 ml	2,6 (g/L)
	3	0,7 ml	1,4 (g/L)		3	1,2 ml	2,4 (g/L)
A.2	1	0,7 ml	1,4 (g/L)	B.2	1	1,2 ml	2,4 (g/L)
	2	0,6 ml	1,2 (g/L)		2	1,2 ml	2,4 (g/L)
	3	0,8 ml	1,6 (g/L)		3	1,1 ml	2,2 (g/L)
A.3	1	1,2 ml	2,4 (g/L)	B.3	1	1,5 ml	3,0 (g/L)
	2	1,6 ml	3,2 (g/L)		2	1,6 ml	3,2 (g/L)
	3	1,4 ml	2,8 (g/L)		3	1,6 ml	3,2 (g/L)

Tabla 4. Contenido en azúcares reductores de cada extracto. El volumen de tiosulfato consumido por el blanco fue V_b=15,6 ml, valor bastante aproximado al valor teórico de blanco del método: 15,15 ml.

6.5 Medición del pH

El tercer parámetro usado para caracterizar los extractos, fue la medición del pH. El aparato utilizado fue un EDGE pH/ORP/Temp con electrodo pH. Se obtuvieron los siguientes datos:

pH	Réplica		
Familia	1	2	3
A1	4,7	4,67	4,63
A2	4,66	4,72	4,66
A3	4,45	4,42	4,44
B1	4,93	4,93	4,94

B2	4,93	4,9	4,95
B3	4,78	4,77	4,77

Tabla 5. pH de los extractos.

A diferencia del contenido en polifenoles, el valor del pH de los extractos es muy regular en cada réplica.

7 Síntesis de nanopartículas

En los capítulos anteriores se describió la formación de nanopartículas como una reacción *redox* producida en un **medio**, donde un **agente reductor** reduce cationes metálicos, y un **estabilizante** protege las nanopartículas resultantes. Los extractos de raspo de uva preparados previamente proporcionan estos tres elementos (medio, reductor y estabilizante) al mismo tiempo.

Sin embargo, hay un cuarto elemento del que no se habló, el **catión metálico** que origina la nanopartícula. En este capítulo, se trata tanto la preparación de las disoluciones que contienen este catión, como el proceso de síntesis de la nanopartículas.

Los metales estudiados a partir de reactivos analíticos fueron el cobre, el zinc y el cadmio; las aguas ácidas de mina con alto contenido en metales también fueron estudiadas.

La síntesis de nanopartículas fue llevada a cabo bajo dos condiciones diferentes. En tubos de ensayo (volumen de la mezcla 10 ml) y en vasos de precipitados (volumen de la mezcla 50 ml).

7.1 Preparación del catión metálico

Se usaron:

- Nitrato de cobre trihidratado (p.a.) Merck.
- Nitrato de Zinc hexahidratado (p.a.) Fluka.
- Nitrato de cadmio tetrahidratado (p.a.) PanReac.
- Muestra de agua mina Tharsis.
- Muestra de agua mina Cueva de la Mora.
- Muestra de agua mina Peña del Hierro.
- Filtro de jeringa RC Agilent Captiva 0,2 μm .
- Matraces.

7.1.1 Disolución de Nitrato de cobre (II)

Se disolvieron 12,080 g de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en un matraz aforado de 50 ml para preparar una disolución 1 M. Se fue diluyendo sucesivamente para obtener concentraciones 0,05 M; 0,01 M; 0,005 M y 0,001 M en matraces de 25 ml. Las disoluciones fueron conservadas a 4° C.

7.1.2 Disolución de Nitrato de Zinc

Se disolvieron 14,874 g de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en un matraz aforado de 50 ml para preparar una disolución 1 M. Se fue diluyendo sucesivamente para obtener concentraciones 0,05 M; 0,01 M; 0,005 M y 0,001 M en matraces de 25 ml. Las disoluciones fueron conservadas a 4° C.

7.1.3 Disolución de Nitrado de Cadmio

Se disolvieron 15,425 g de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en un matraz aforado de 50 ml para preparar una disolución 1 M. Se fue diluyendo sucesivamente para obtener concentraciones 0,05 M; 0,01 M; 0,005 M y 0,001 M en matraces de 25 ml. Las disoluciones fueron conservadas a 4° C.

7.1.4 Aguas de minas

Se extrajo 30 ml cada una de las muestras de aguas de minas, después de agitarlas para homogenizarlas. Estos 30 ml fueron filtrados usando un filtro de jeringa RC Agilent Captiva 0,2 μm . Las muestras filtradas fueron conservadas a 4° C.

7.2 Síntesis en tubos de ensayo

7.2.1 Materiales, reactivos e instrumentos

- Disolución de Nitrato de cobre (II).
- Disolución de Nitrato de Zinc.
- Disolución de Nitrado de Cadmio.
- Extracto de raspo de uva.
- Agua ultrapura.
- Tubos de ensayo 10 ml.
- Matraces aforados, vasos de precipitados, etc.
- Parafilm M®.
- Filtro de jeringa RC Agilent Captiva 0,2 μm .
- Jeringa de plástico estéril de 10 ml.
- Pipetas electrónicas 1 ml, 5 ml, 10 ml.

7.2.2 Síntesis

La síntesis se produjo en tubos de ensayo con capacidad para 10 ml de líquido (Fig. 19). El procedimiento general fue el siguiente.

1. Colocar 1 ml de extracto en todos los tubos de ensayo.
2. Agregar 8 ml de agua ultrapura en todos los tubos de ensayo.
3. Introducir 1 ml de la disolución de Cobre, Zinc o Cadmio correspondiente; o 1 ml de agua ultrapura en el caso del blanco.
4. Cubrir rápidamente con Parafilm M® y agitar para homogeneizar la disolución.
5. Dejar reaccionar el tiempo requerido a la temperatura estudiada.
6. Filtrar con un filtro de jeringa RC Agilent Captiva 0,2 μm .

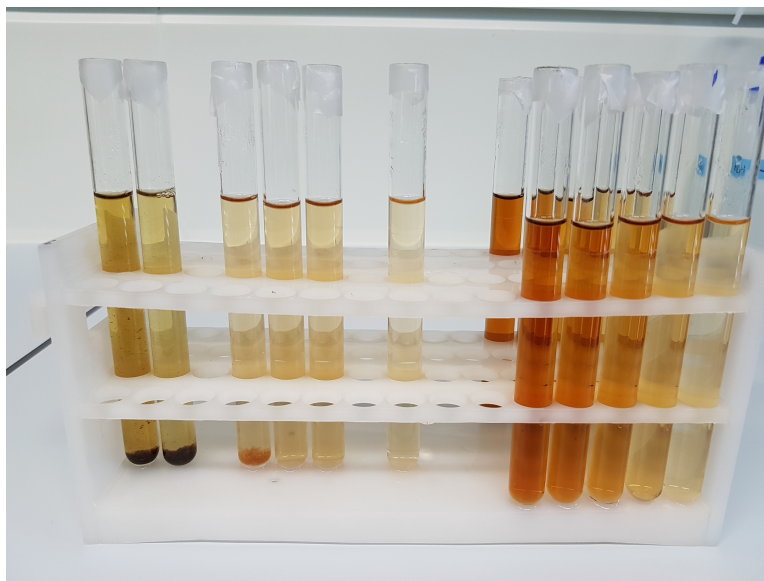


Fig. 19. Síntesis de nanopartículas en tubos de ensayo de 10 ml.

7.3 Síntesis en vasos de precipitados

7.3.1 Materiales, reactivos e instrumentos

- Disolución de Nitrato de cobre (II).
- Disolución de Nitrato de Zinc.
- Disolución de Nitrato de Cadmio.
- Extracto de raspo de uva.
- Agua ultrapura.
- Vaso de precipitados de 150 ml.
- Matraces aforados, vasos de precipitados, etc.
- Agitador magnético AGIMATIC-N SELECTA.
- Bomba peristáltica MINIPULS® 3 GILSON.
- Pipetas electrónica 10 ml.
- Micropipeta de 1000 μ l.

7.3.2 Síntesis

El objetivo de esta síntesis en cantidades mayores fue la monitorización continua de la evolución del espectro UV-Vis a medida que se producía la reacción. Por este motivo se realizó un montaje (Fig. 20) que incluía los siguientes módulos:

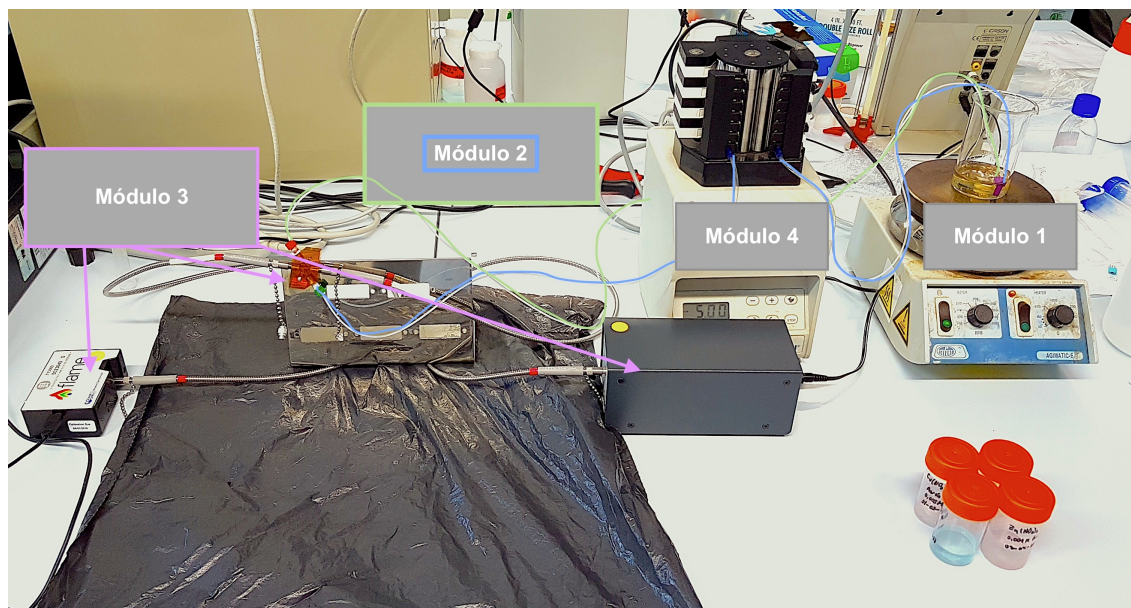


Fig. 20. Montaje de síntesis de nanopartículas con monitorización UV-Vis.

- Módulo 1 – Reactor CSTR (Volumen ~44,67 ml): vaso de precipitados de 150 ml agitado magnéticamente a 900 rpm. La velocidad fue aumentada al máximo en los 10 s posteriores a la adición de la disolución con cationes metálicos para asegurar la homogeneización de la mezcla. Luego se bajó la velocidad a los 900 rpm de trabajo, a velocidades más elevadas aumenta la probabilidad de la formación de burbujas.
- Módulo 2 – Reactor PFR (Volumen ~5,33 ml): Combinación de tubos de teflón y silicona (por tramos) de 0,8 mm de diámetro y 2,65 m de longitud. Su función es la de servir de canal por donde se transporta el líquido del módulo 1 a la celda de detección del módulo 3 para que sea analice su espectro UV-Vis.
- Módulo 3 – Espectrómetro Flame-S OCEAN OPTICS: Analiza el espectro UV-Vis de la disolución para monitorizar la síntesis de las nanopartículas.
- Módulo 4 – Bomba peristáltica: Su función es mover el líquido desde el módulo 1, a través del módulo 2.

El volumen inicial de trabajo son 50 ml de disolución en el vaso de precipitados de 150 ml, pero una vez se empieza a hacer circular la disolución, hay un volumen de ~5,33 ml de disolución dentro de los tubos y ~44,67 ml de disolución en el vaso de 150 ml en todo momento.

De esta manera, la síntesis se produjo de la siguiente manera.

1. Se colocó en un matraz aforado de 250 ml, 25 ml de extracto y se enrasó con agua ultrapura.
2. Se añadió la sal metálica concentrada – $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ / $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ / $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – de manera que su volumen no supusiera más del 2% del volumen total involucrado. (E.g. 500 μl de sal metálica en 50 ml de disolución extracto-agua ultrapura).

8 Resultados y discusión

8.1 Polifenoles, azúcares reductores y pH

La cantidad de polifenoles es la característica medida que muestra más dispersión de valores, especialmente en los extractos que se originan en los pedicelos. Los valores de las fracciones intermedia y fina son muy similares, mientras los extractos de las fracciones grandes contienen menos polifenoles (Fig. 21).

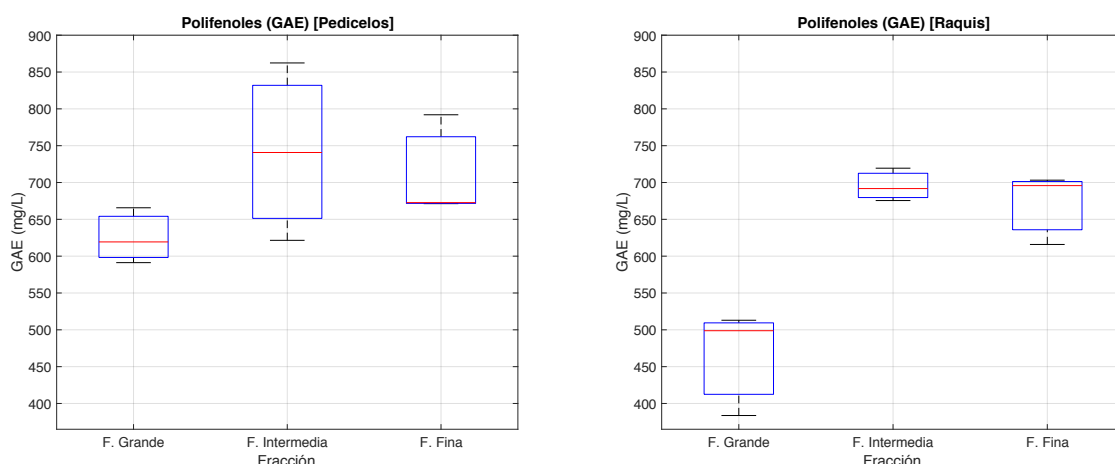


Fig. 21. Polifenoles pedicelos-raquis.

El contenido en polifenoles de los extractos es en general más alto en los extractos de los pedicelos que en los del raquis, salvo para la fracción fina donde los valores son más aproximados (Fig. 22).

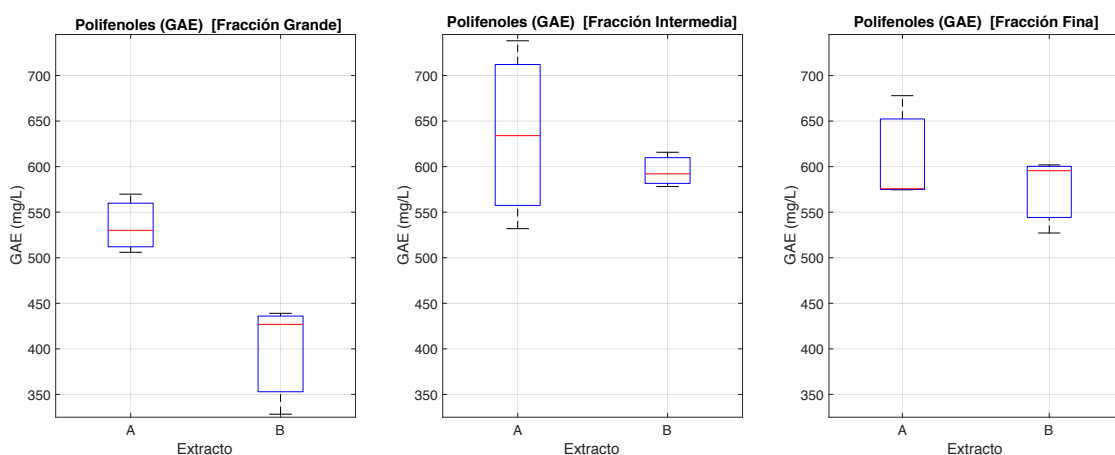


Fig. 22. Polifenoles tamaño de fracción de raspo de uva.

Tanto para el raquis como para los pedicelos, la cantidad de azúcares de cada extracto aumenta en las fracciones pequeñas (Fig. 23).

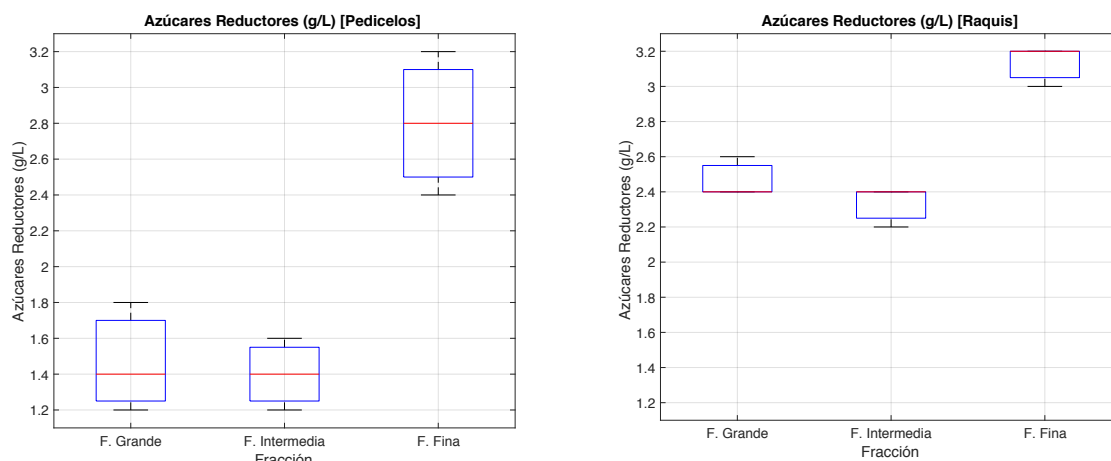


Fig. 23. Azúcares reductores pedicelos-raquis.

Se puede observar que el raquis contiene más azúcares reductores, independientemente de la fracción estudiada. Además su dispersión de valores es menor (Fig. 24).

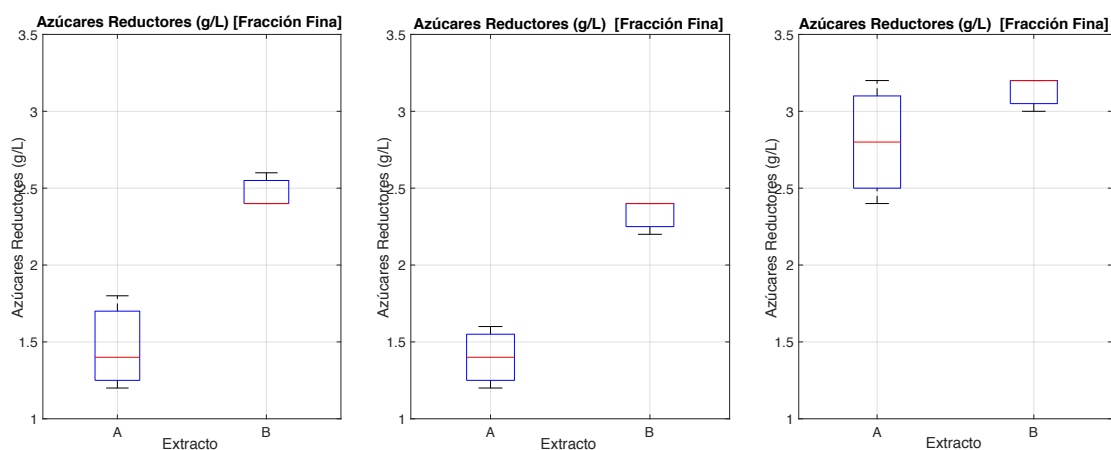


Fig. 24. Azúcares Reductores tamaño de fracción de raspo de uva.

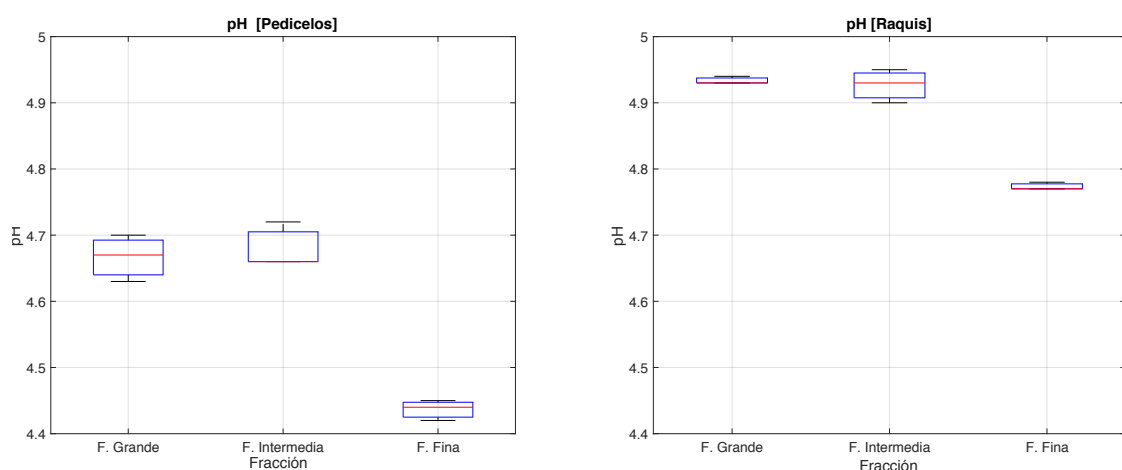


Fig. 25. pH pedicelos-raquis.

En lo que concierne al pH, se pueden establecer dos comportamientos claros:

- El pH de los extractos de los pedicelos es más bajo que el de los del raquis (Fig. 25).
- El pH en las fracciones intermedias y grandes es similar, en cambio hay una bajada pronunciada en los extractos de fracción fina (Fig. 26).

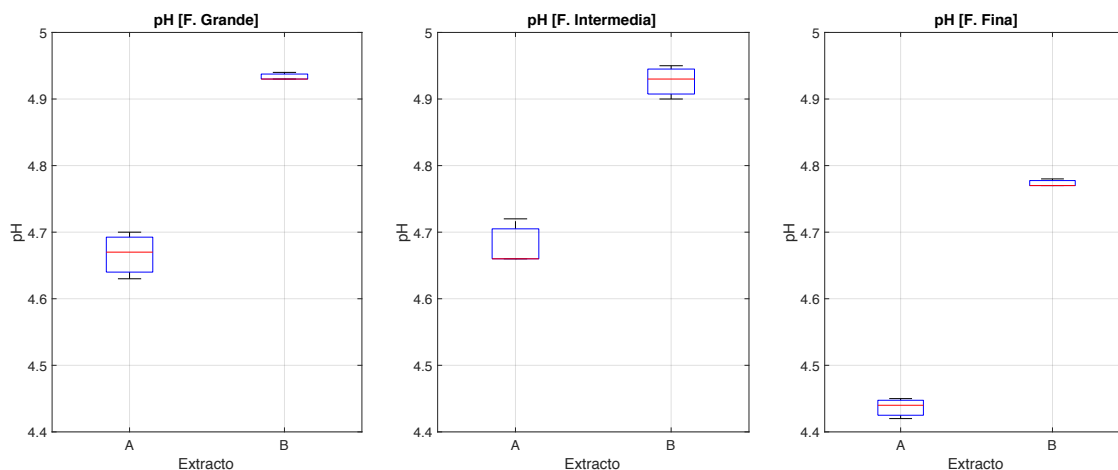


Fig. 26. pH tamaño de fracción de raspo de uva.

A partir de estos resultados, se puede concluir que los extractos hechos usando el raquis comportan importantes ventajas en lo que respecta al contenido de azúcares reductores y una baja dispersión de resultados. Este último punto es de vital importancia si se desea realizar experimentos que aseguren la máxima reproducibilidad posible.

Ante este panorama, hay que valorar si las ventajas que suponen el mayor contenido en polifenoles de los pedicelos son lo suficientemente relevantes. Al menos en las fracciones grandes e intermedias.

8.2 Los metales estudiados: Cu, Zn, Cd

Se experimentó en tubos de ensayo de 10 ml con:

- 1 ml de disoluciones de Cu, Zn y Cd de concentraciones 0,05 M; 0,01 M; 0,005 M y 0,001 M.
- 8 ml de agua ultrapura.
- 1 ml de los extractos B 1.3, A 1.3 y A 2.1. Con contenidos bajo (328,3 mg/L GAE), intermedio (569,8 mg/L GAE) y alto (738,1 mg/L GAE) en polifenoles.

La síntesis duró 2 h a 80° C. Al acabar se enfrió rápidamente hasta temperatura ambiente y se guardó a 4° C hasta su análisis (4 días después).

Se obtuvieron espectros UV-Vis para las disoluciones de Cu con los tres extractos mencionados. Las disoluciones de Zn y Cd no mostraron espectros claramente diferenciados de lo que podría considerarse ruido de fondo, así que se descartó su estudio.

Los espectros de las disoluciones de cobre con absorbancias más relevantes fueron los que usaban 1 ml de disolución 1 mM (0,1 mM en los 10 ml) (Fig. 27). En las muestras que tenían concentraciones más elevadas apareció un precipitado marrón.

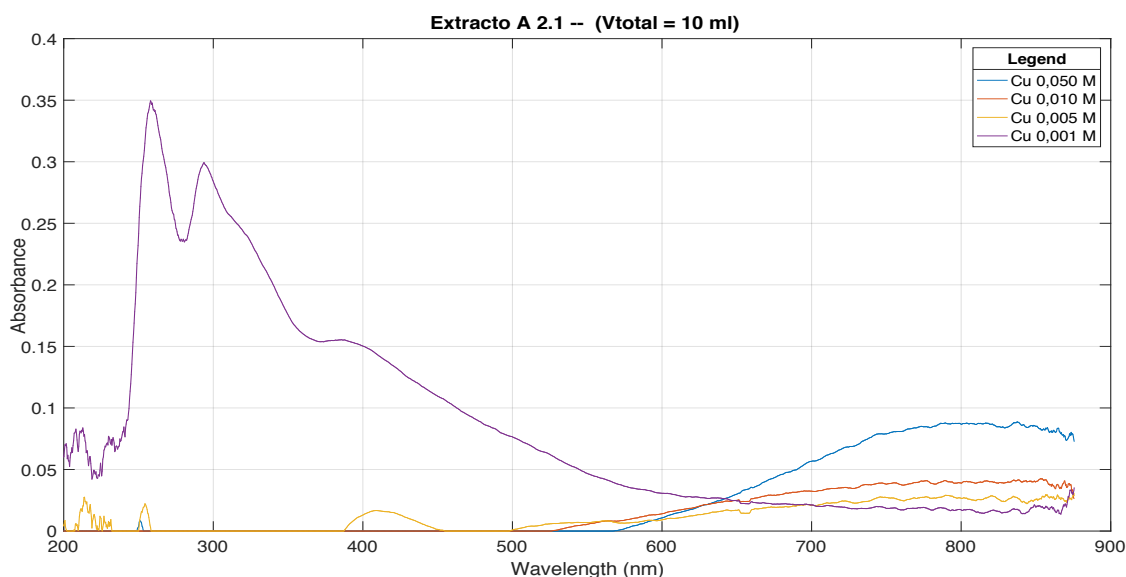


Fig. 27. UV-Vis CuNP.

Ante la posibilidad el Zn o el Cd pudieran presentar plasmón de resonancia en los instantes posteriores a la reacción, se probó la monitorización continua a temperatura ambiente durante dos horas. Tampoco se encontraron indicios que el UV-Vis fuera una técnica que permitiera observar la formación de nanopartículas de esos dos metales en estas condiciones.

8.3 Efecto de la concentración utilizada

Se experimentó en tubos de ensayo de 10 ml con:

- 1 ml de disoluciones de Cu, de concentraciones 0,001 M-0,010 M.
- 8 ml de agua ultrapura.
- 1 ml de los extractos A 3.3, B 2.1, A 1.1 y B 1.1. Extractos con alto y bajo contenido en polifenoles procedente tanto de raquis como de pedicelos (Tabla 3).

La síntesis duró 2 h a 80° C. Al acabar se enfrió rápidamente hasta temperatura ambiente y se analizó.

El parámetro estudiado en este caso era la variación del espectro para concentraciones crecientes de la disolución de cobre.

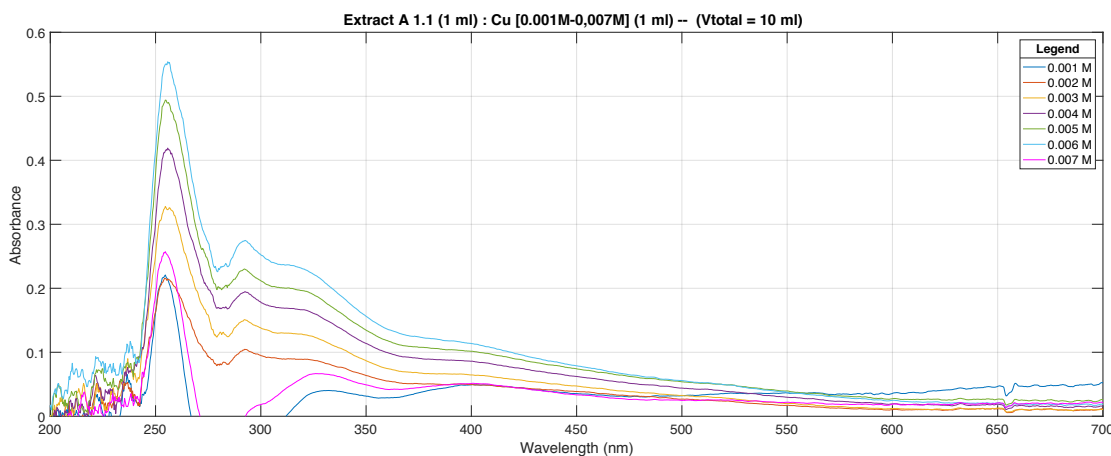


Fig. 28. UV-Vis Concentraciones crecientes A1.1. Cu (0,001 M-0,007 M).

En la Fig. 28 se observa un crecimiento en el espectro de acuerdo con la concentración de disolución de cobre utilizada. Este crecimiento se observó hasta la muestra que empleó 1 ml 0,006 M. A partir de esta muestra, el espectro cayó notablemente, hecho que coincide con el inicio de la precipitación de cobre (Fig. 30).

Los espectros posteriores, en algunos extractos presentaban una señal más pequeña (Fig. 29), pero en otros el espectro se volvió imperceptible.

No obstante, después de dos horas a 80° C la reacción aún no había acabado. Las muestras se almacenaron a 4° C, pero al día siguiente la muestra que dio máxima señal había precipitado (0,006 M) (Fig. 31).

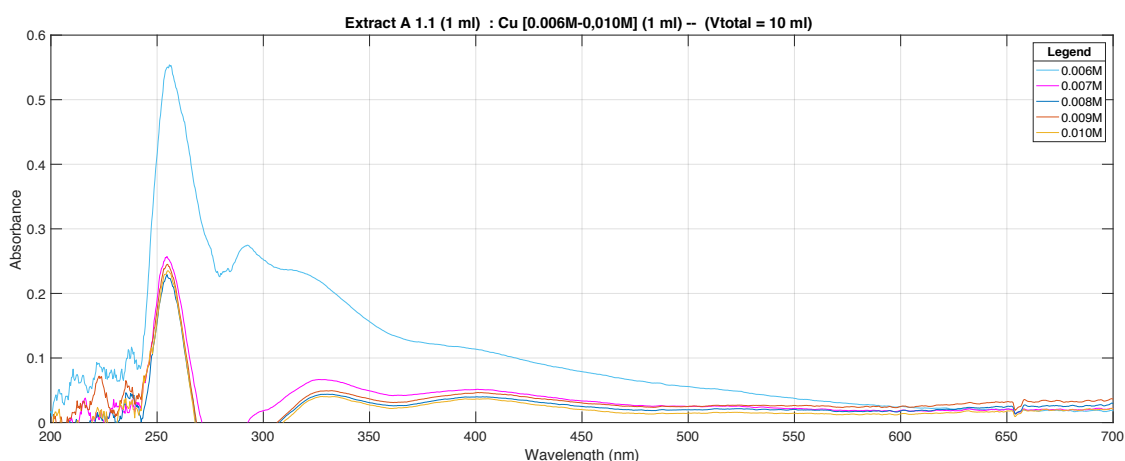


Fig. 29. UV-Vis Concentraciones crecientes A1.1. Cu (0,006 M-0,010 M)

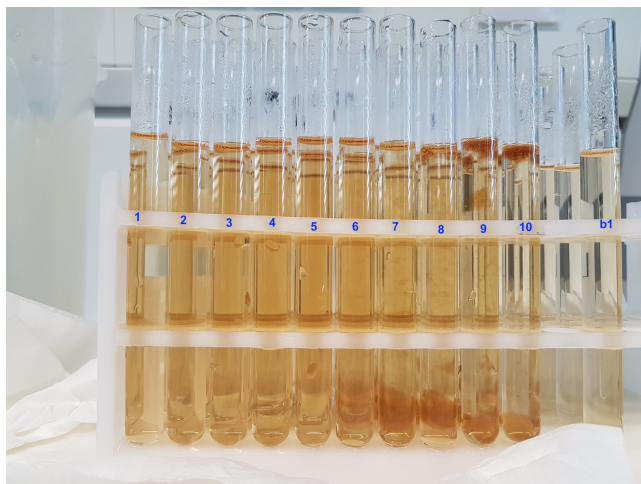


Fig. 30. Concentraciones crecientes A1.1, inmediatamente después de la síntesis.

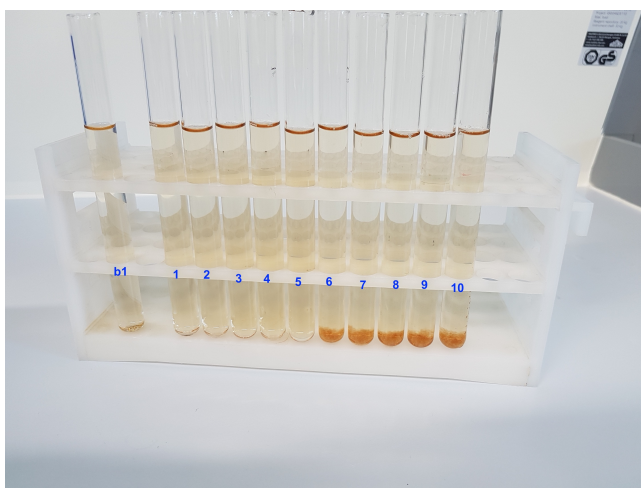


Fig. 31. Concentraciones crecientes A1.1, 1 día después de la síntesis.

8.4 Efecto de la proporción de extracto

Se experimentó en tubos de ensayo de 10 ml con:

- 1ml de disolución de Cu de concentración 0,002 M.
- Extracto B 3.3: 1 ml, 2 ml, 4 ml, 6 ml, 8 ml.
- Agua ultrapura para alcanzar los 10 ml.

La síntesis duró 2 h a 80° C. Al acabar se enfrió rápidamente hasta temperatura ambiente y se conservó a 4° C (se analizó a los 6 días).

El espectro de la primera muestra (Fig. 32) guarda cierto parecido con las otras sintetizadas en condiciones similares (máximos alrededor de 250 nm y 290 nm). Pero a medida que se aumenta la proporción de extracto, el máximo del espectro se va desplazando a longitudes de onda menos energéticas. La bibliografía indica que el plasmón de resonancia del cobre

está alrededor de los 560 nm. Sin embargo, también hay trabados que han encontrado máximos de absorbancia a 294 nm y que estos van desplazándose a medida que avanza la reacción. Este hecho lo explican por el aumento o disminución del tamaño de las nanopartículas existentes.

El aumento de la cantidad de cationes de cobre disponibles está ligada al incremento de la absorbancia y el incremento de la cantidad de extracto a desplazamientos en la longitud de onda del máximo de absorbancia (Fig. 33).

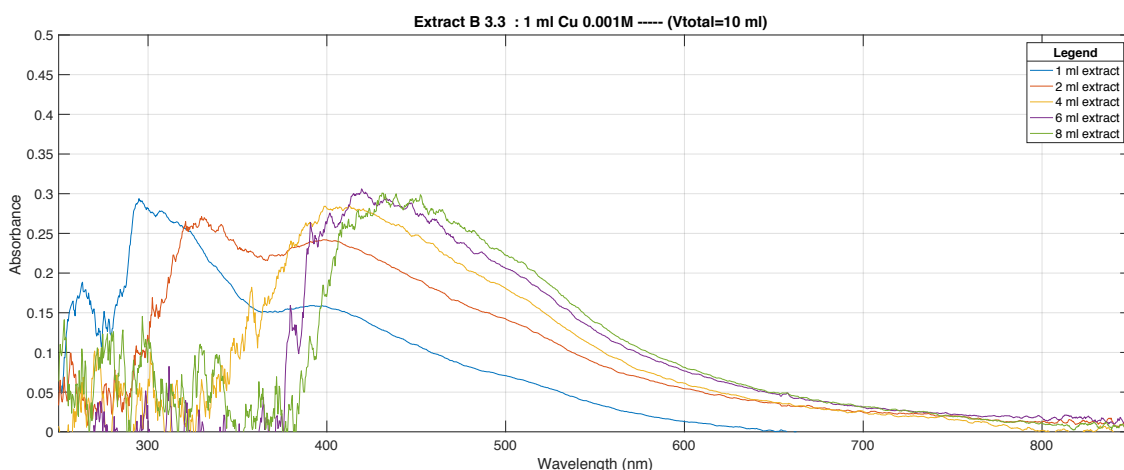


Fig. 32. UV-Vis proporción de extracto.

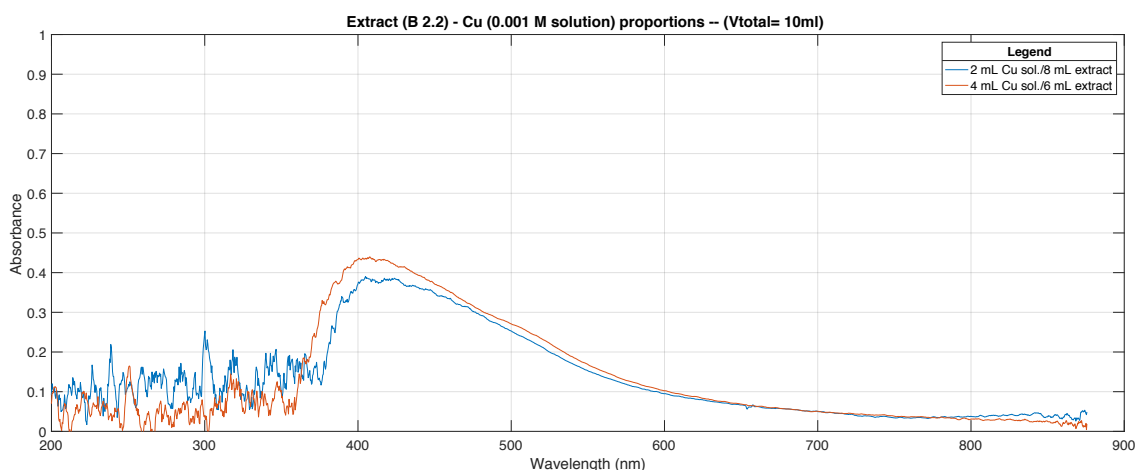


Fig. 33. UV-Vis proporción de extracto y concentración de Cu.

8.5 Efecto del extracto utilizado

Se experimentó en tubos de ensayo de 10 ml con:

- 1ml de disolución de Cu concentración 0,001 M.
- 1ml de extracto, para todos los extractos.

- 8 ml de agua ultrapura.

La síntesis duró 2 h a 80° C. Al acabar se enfrió rápidamente a temperatura ambiente y se analizó.

En el caso de los extractos, no se pudo establecer una relación causal clara entre el contenido de polifenoles o el pH, y la forma del espectro de absorbancia.

No obstante, existe una tendencia más o menos apreciable de la absorbancia del pico de 294 nm, que sigue la distribución de los polifenoles, es decir, más elevada para los pedicelos en la fracción grande e intermedia, y para el raquis en la fracción fina (Fig. 34, Fig. 35 y Fig. 36).

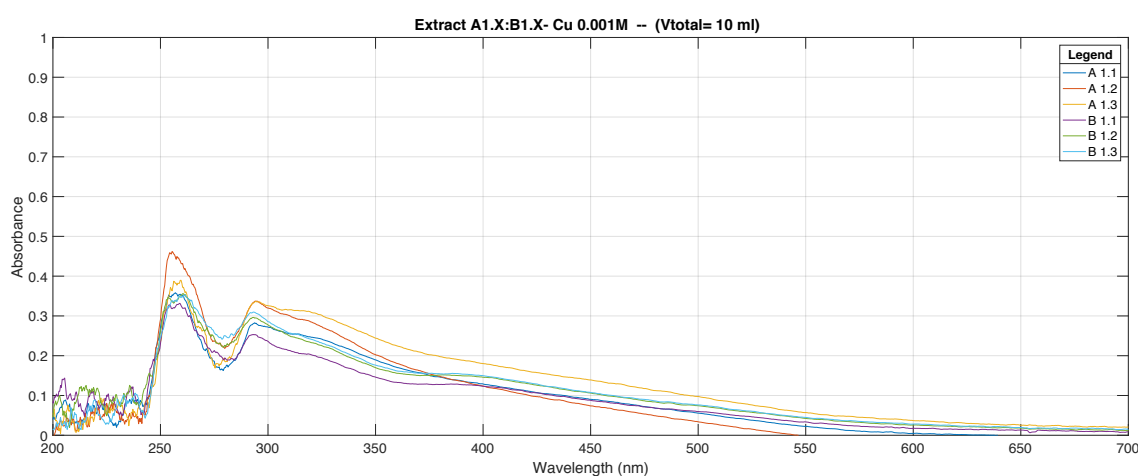


Fig. 34. UV-Vis Extracto fracción grande.

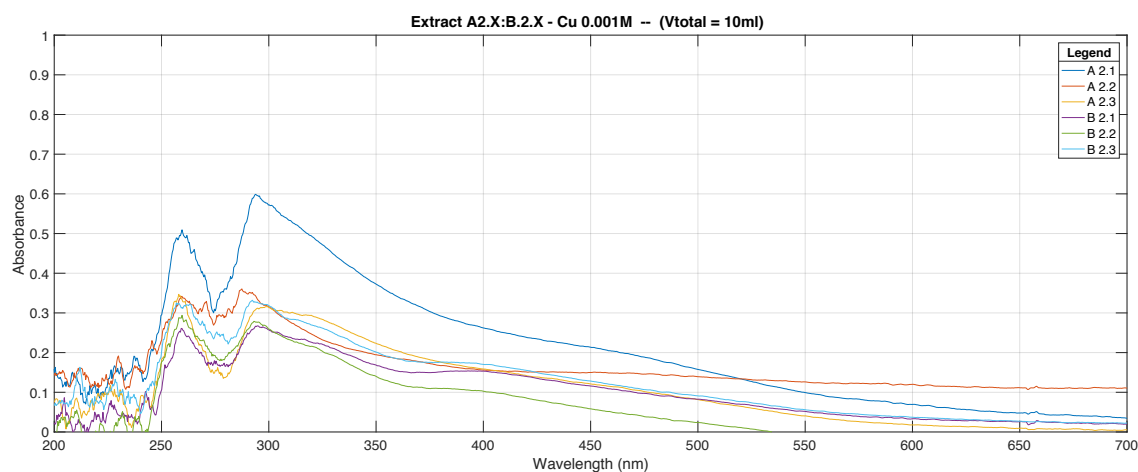


Fig. 35. UV-Vis Extracto fracción intermedia.

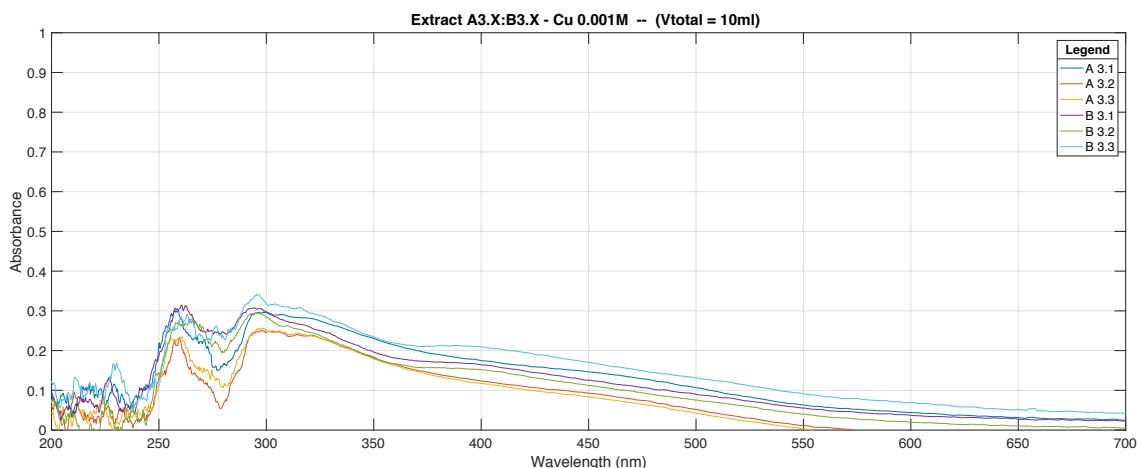


Fig. 36. UV-Vis Extracto fracción fina.

Para comprobar esta hipótesis, se crearon espectros cuyas absorbancias eran la media aritmética de las tres réplicas y se compararon caso a caso. Efectivamente, los espectros medios de los pedicelos tenían absorbancias medias más altas en la fracción grande e intermedia, y más pequeños que los del raquis para la fracción fina.

Sin embargo, la diferencia no era tan grande que no pudiera ser atribuida al ruido de fondo o a errores de reproducibilidad. Es una relación que requiere más estudio.

8.6 Efecto del tiempo

Se experimentó en tubos de ensayo de 10 ml con:

- 1ml de disolución de Cu concentración 0,001 M.
- 1ml de extracto A 2.2.
- 8 ml de agua ultrapura.

La síntesis fue a 80° C. Se iba sacando cada muestra con su blanco respectivo en intervalos de 10 min. Al acabar se enfriaban rápidamente hasta temperatura ambiente y se analizaron.

Experimentos similares se llevaron a cabo en múltiples ocasiones, pero en ninguno se observó un crecimiento monótono de la absorbancia en función del tiempo. En la mayoría de los casos había crecimientos agrupados en ciertos intervalos, periodos de crecimiento nulo y ocasionales disminuciones en la absorbancia (Fig. 37). Estos comportamientos fueron atribuidos a errores experimentales derivados de la dificultad en la reproducción de las condiciones para todas las muestras.

Una manera más efectiva de ver la evolución temporal del espectro de absorbancia requiere no solo la monitorización continua, discutida más adelante, sino también que el análisis sea

sobre la misma muestra. En este trabajo, se realizó dicho análisis a temperatura ambiente en el apartado **8.10** Monitorización continua del espectro UV-Vis.

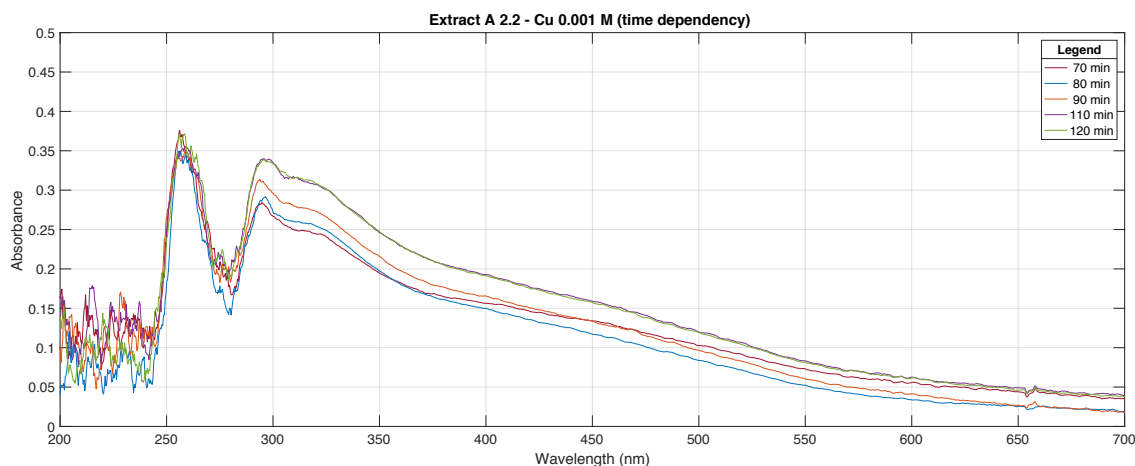


Fig. 37. UV-Vis efecto del tiempo 10 ml.

8.7 Efecto del filtrado

Se experimentó en tubos de ensayo de 10 ml con:

- 1ml de disolución de Cu concentración 0,001 M.
- 1ml de extracto A 3.1.
- 8 ml de agua ultrapura.

La síntesis fue a 80° C. Se fue sacando cada muestra con su blanco a los: 20, 60, 80, y 120 min. Al acabar se enfriaron rápidamente hasta temperatura ambiente y se analizaron.

En este apartado se investigó el efecto del filtrado (filtro 200 nm) sobre la absorbancia.

En primer lugar se vio el filtrado en función del tiempo, para ello se realizaron cuatro análisis por cada muestra:

- Espectro de la muestra filtrada usando el blanco filtrado (FS-FB).
- Espectro de la muestra no filtrada usando el blanco filtrado (US-FB).
- Espectro de la muestra filtrada usando el blanco no filtrado (FS-UB).
- Espectro de la muestra no filtrada usando el blanco no filtrado (US-UB).

Como era de esperar, el espectro de US-FB era el más elevado y el de FS-UB el más bajo. Se vio que si blanco y muestra eran filtrados, o no-filtrados, el espectro no era suficientemente diferente para suponer la relevancia del filtrado (Fig. 38 y Fig. 39).

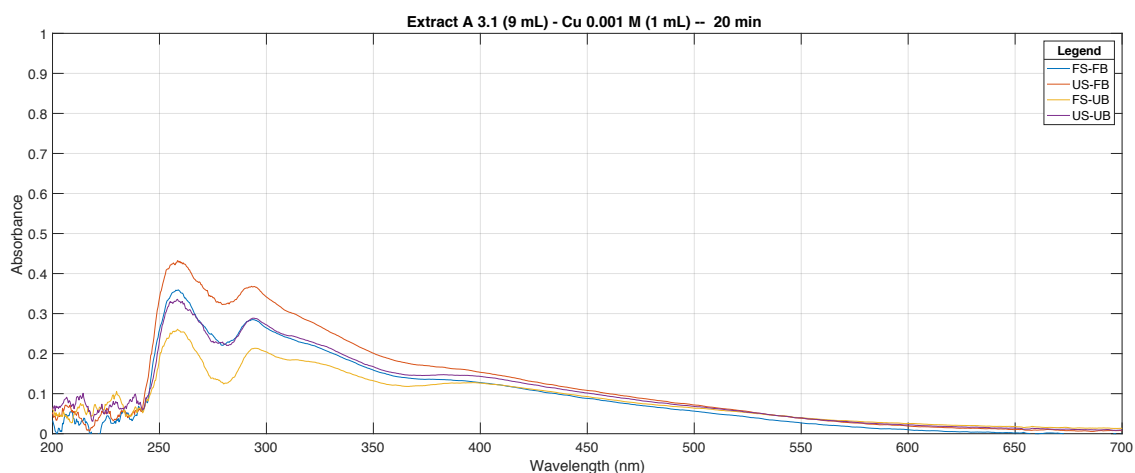


Fig. 38. UV-Vis efecto del filtrado 20 min.

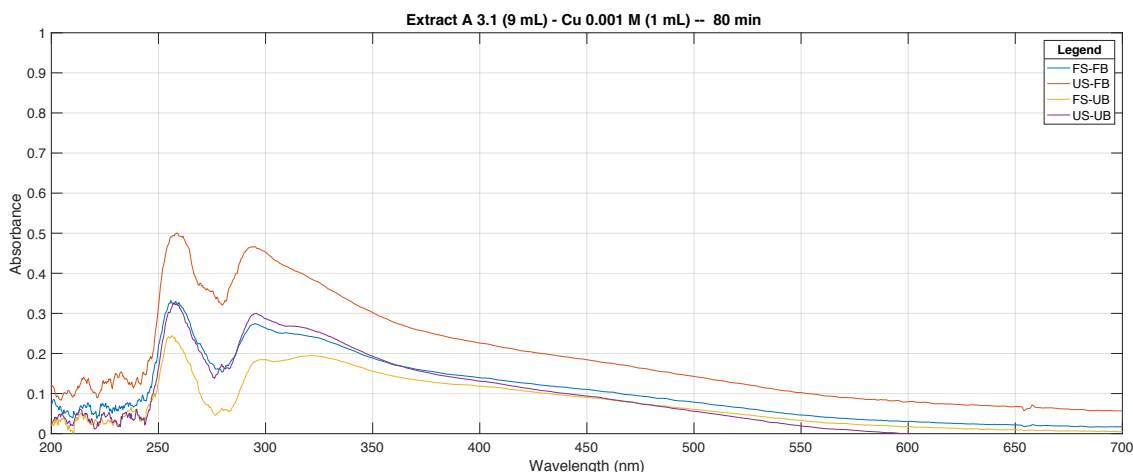


Fig. 39. UV-Vis efecto del tiempo 80 min.

En segundo lugar se vio el filtrado en función de la concentración (120 min a 80° C), para ello se realizaron solamente dos análisis por cada muestra, los que debían ser iguales:

- Espectro de la muestra filtrada usando el blanco filtrado (FS-FB).
- Espectro de la muestra no filtrada usando el blanco no filtrado (US-UB).

Se observó que para volúmenes de cobre añadidos con concentración inferiores a 1 ml de Cu 0,005 M la diferencia entre las absorbancias era pequeña (Fig. 40).

Sin embargo, a partir de ese valor y para el resto de concentraciones, el efecto del filtrado fue enorme, ver líneas amarilla sólida y discontinua de la Fig. 40. Dado que el filtrado se produjo con un filtro de 200 nm, se puede imputar este comportamiento al aumento del tamaño de las nanopartículas de cobre por sobre de ese diámetro.

En el momento del análisis, en la muestra 0,006 M, no había precipitado. Pero como se vio en la inspección del día siguiente, durante la noche el cobre se aglomeró y precipitó (Fig. 31).

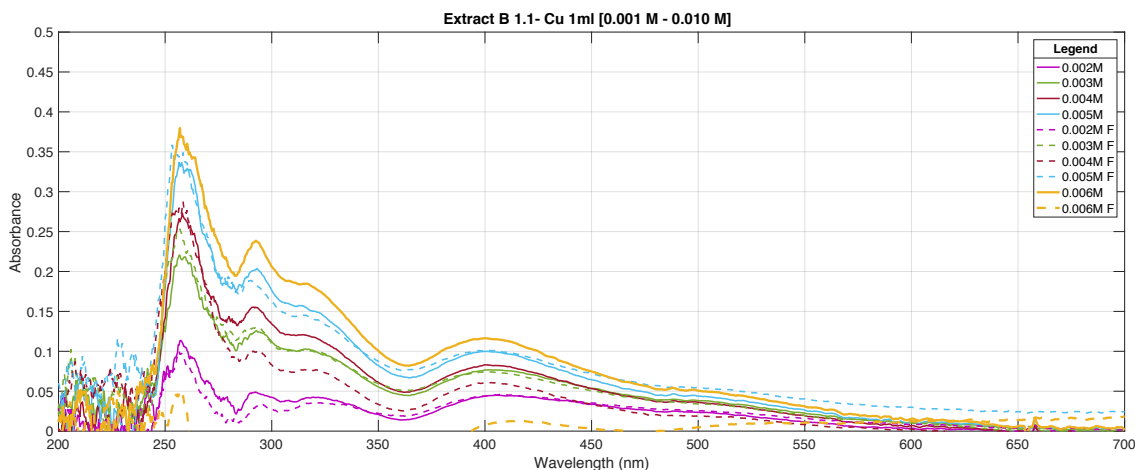


Fig. 40. UV-Vis efecto del filtrado-concentraciones

8.7.1 Análisis SEM y EDX

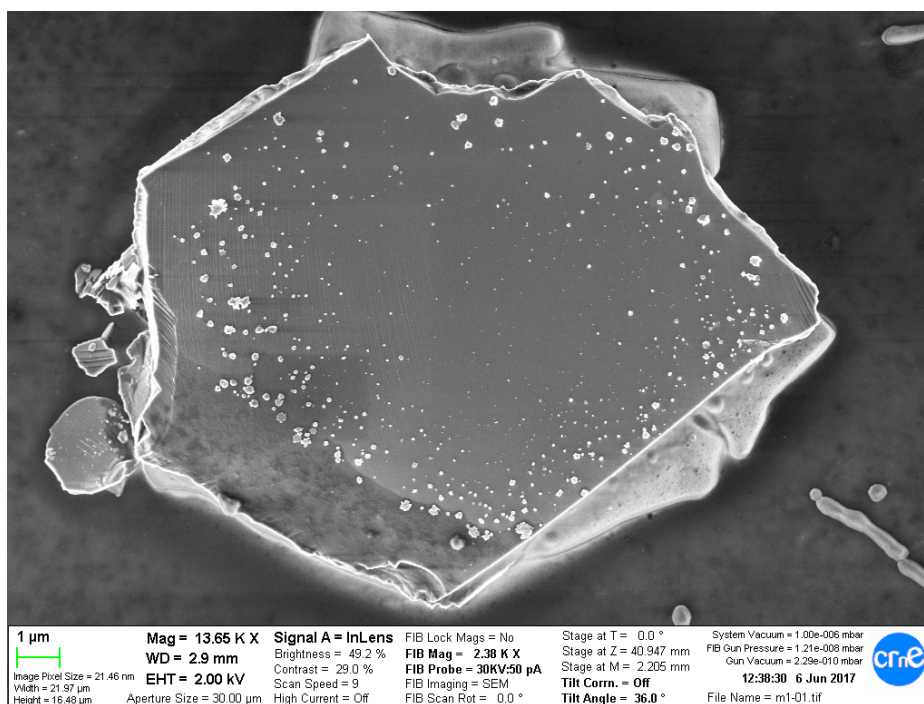


Fig. 41. SEM Muestra de nanopartículas de cobre filtrada, Extracto A3.3.

Se llevó a cabo un análisis SEM usando un aparato Zeiss Neon-40 EsB FIB-SEM. La muestra analizada contenía nanopartículas de diferentes tamaños, mayormente esféricas (Fig. 41).

No se encontraron nanopartículas mayores que los 200 nm, hecho que es coherente con el tamaño del filtro utilizado al preparar la muestra para su análisis (Fig. 42).

El análisis EDX, usando un detector INCA PentaFET-x3 de Oxford Instruments, reveló que eran nanopartículas de cobre (Fig. 43).

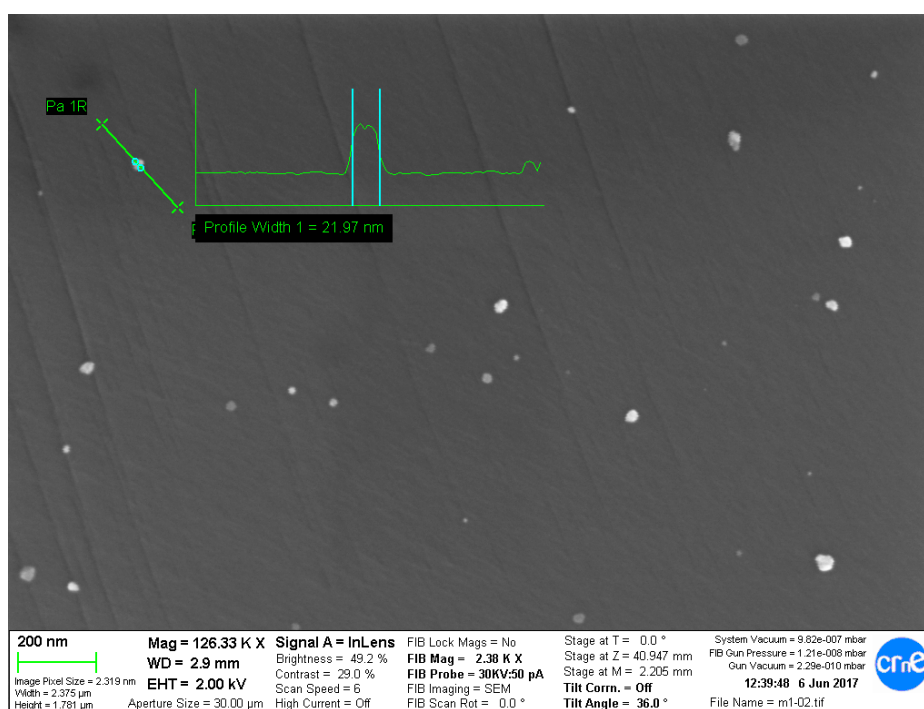


Fig. 42. SEM tamaño de las nanopartículas de cobre filtradas.

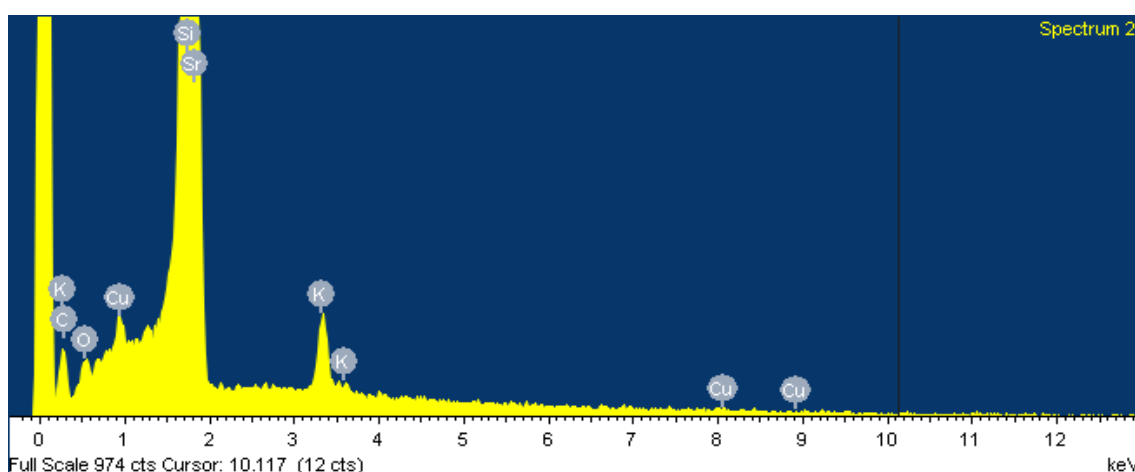


Fig. 43. EDX Análisis elemental.

8.8 Efecto de la temperatura en la medición UV-Vis

Se estudió una de las muestras en las que se determinaba el efecto del tiempo.

El análisis reveló que los espectros de la misma muestra varían poco en función de la temperatura de análisis, ya sea a 80° C, a temperatura ambiente (22° C), o a 4° C (Fig. 44).

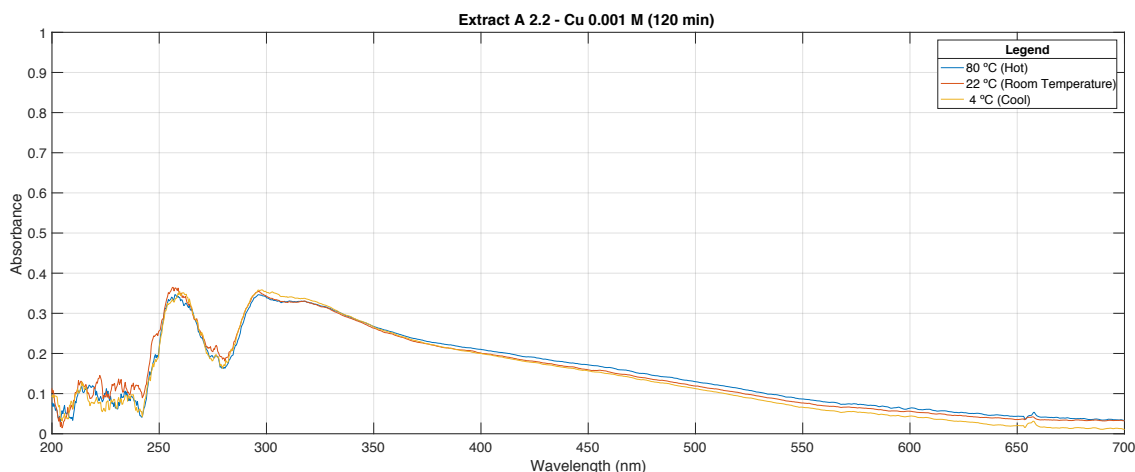


Fig. 44. UV-Vis efecto de la temperatura de análisis.

8.9 Ensayos con muestras reales: aguas ácidas de mina

Se experimentó en tubos de ensayo de 10 ml con:

- 0,5 ml, 1 ml y 5 ml de disolución de aguas de minas.
- 1 ml de extracto A 3.3.
- Agua ultrapura hasta llegar a 10 ml.

La síntesis duró 30 min a temperatura ambiente. Se analizó inmediatamente después.

En los tubos preparados con muestras de las minas Cueva de La Mora y Tharsis hubo una aglomeración y precipitación inmediatas. A pesar de la precipitación, las muestras exhibían espectro UV-Vis (Fig. 45 y Fig. 47).

Las muestras de la Mina Peña del Hierro (Fig. 46), no llegaron a precipitar. Por esta razón se decidió analizar su respuesta en el SEM. Se sintetizaron nuevas muestras con las mismas concentraciones a 80° C durante dos horas. En este segundo caso, en que se aumentaron el tiempo y la temperatura de reacción, todas las muestras precipitaron.

Una posible explicación a este hecho es que con el aumento de la agitación térmica, el efecto estabilizante de polifenoles, azúcares reductores y otros compuestos orgánicos fuera insuficiente para evitar el crecimiento incontrolado de las nanopartículas y su precipitación.

A esto hay que añadir que tanto los polifenoles como los azúcares reductores podrían haber continuado reduciendo aquellos iones de cobre hasta entonces presentes.

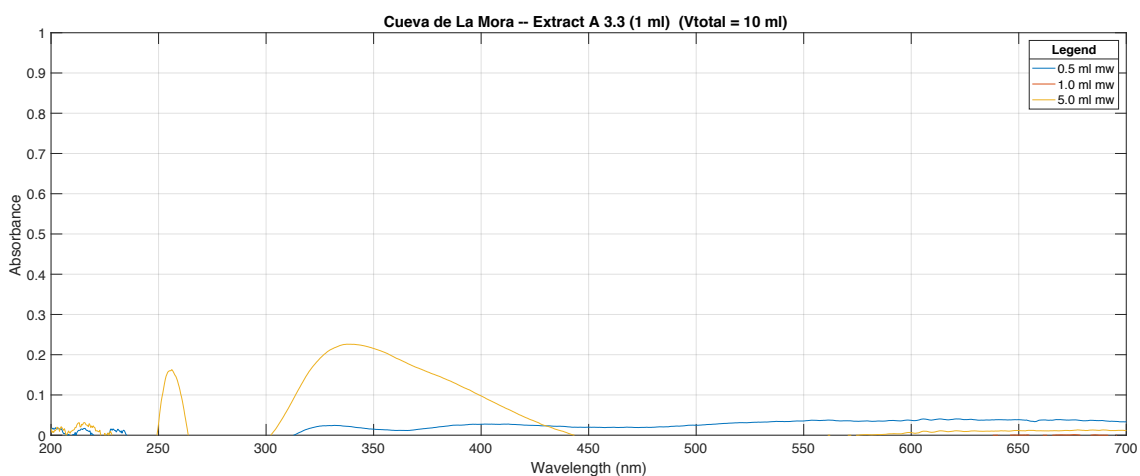


Fig. 45. UV-Vis Mina Cueva de La Mora.

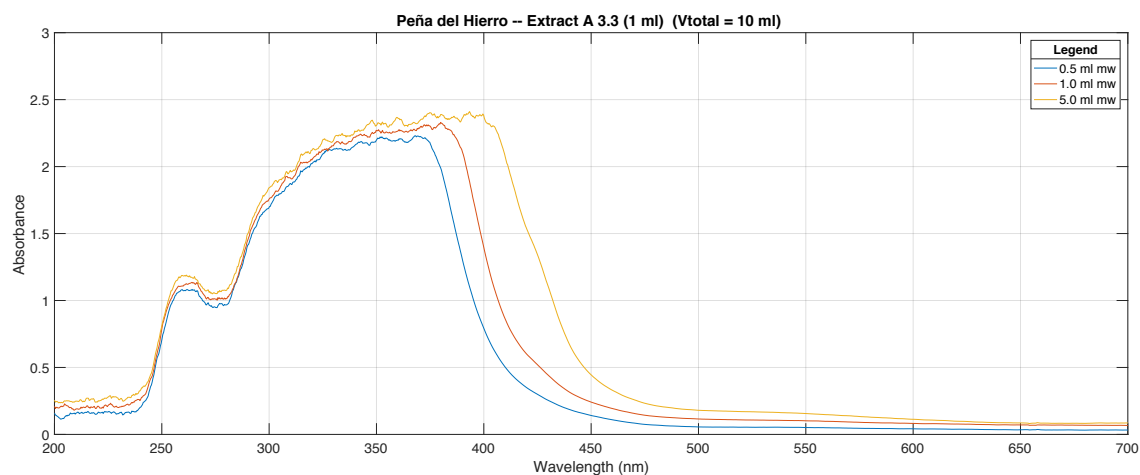


Fig. 46. UV-Vis Mina Peña del Hierro.

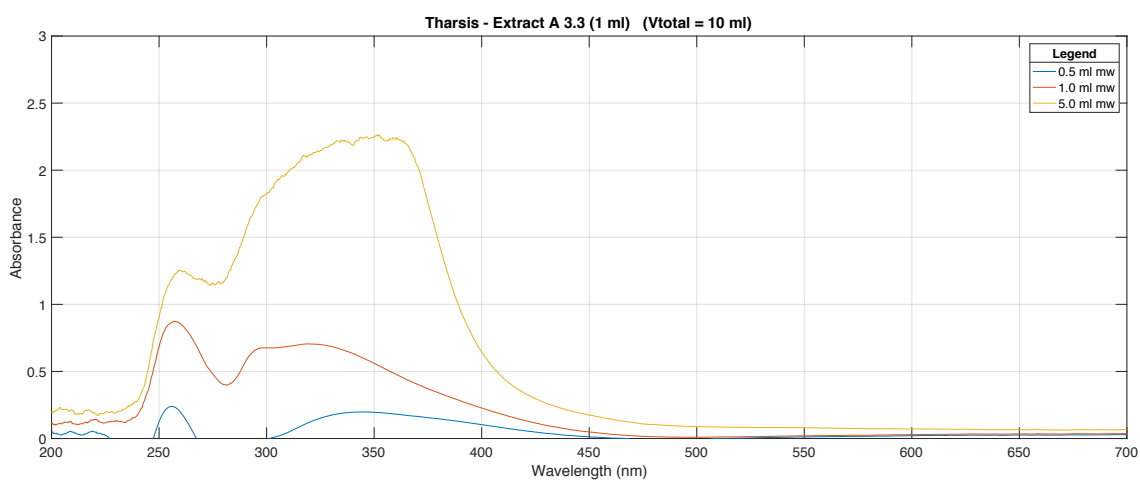


Fig. 47. UV-Vis Mina Tharsis.

La diferencia en el comportamiento de las aguas de mina se debe a su diferente composición química. Un análisis ICP mostró que el contenido de azufre, hierro y cobre de Peña del Hierro era: 28, 183 y 5 veces más grande que en Cueva de La Mora, y 20, 21 y 0,9 que en Tharsis.

8.9.1 Análisis SEM y EDX

Las muestras anteriores fueron filtradas y llevadas al SEM. Estas no permitieron un análisis en profundidad debido a la formación de una capa gruesa rica en azufre (Fig. 48); el EDX (Fig. 49) reveló contenidos en azufre y hierro del agua de minas, y potasio del propio extracto.

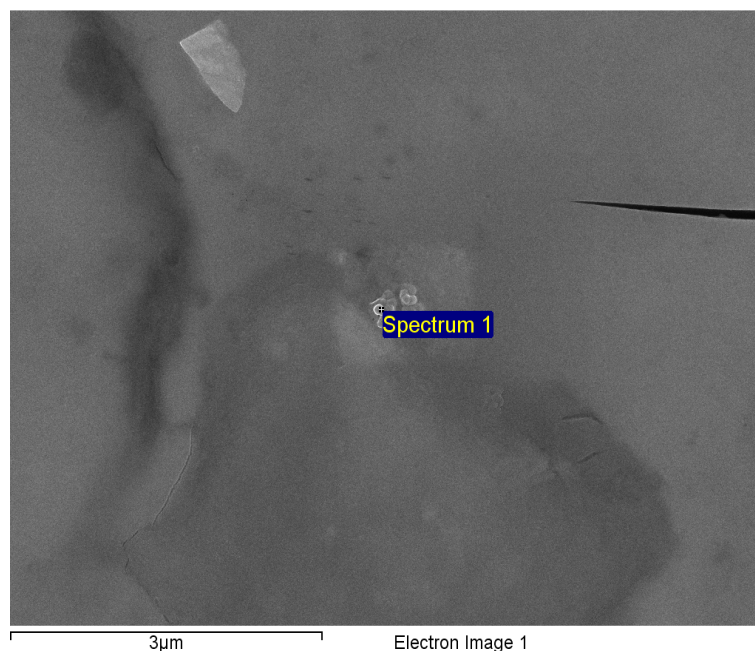


Fig. 48. SEM Mina 2 (1 ml).

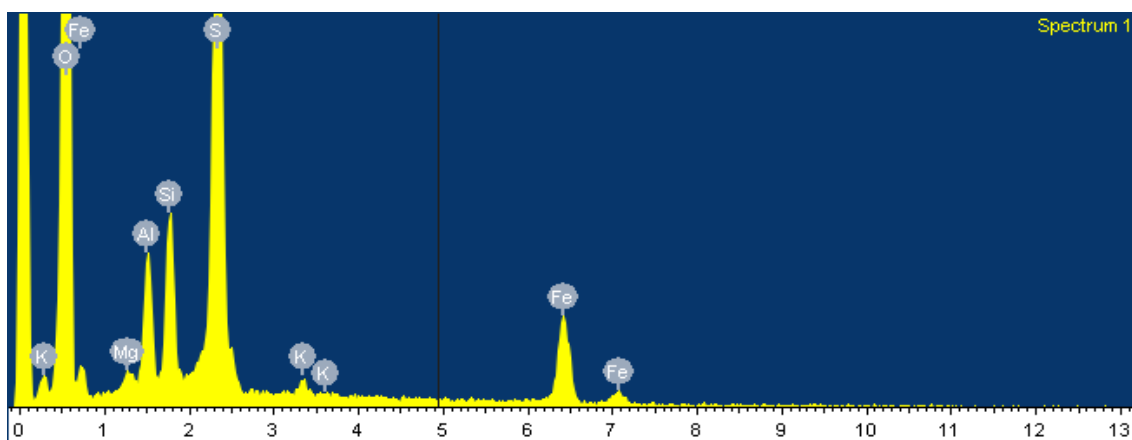


Fig. 49. EDX Mina 2 (1 ml).

8.10 Monitorización continua del espectro UV-Vis

Se prepararon muestras de acuerdo al procedimiento 7.3 Síntesis en vasos de precipitados. El análisis del espectro mostró que al principio la reacción era rápida (Fig. 50), pero luego disminuía su velocidad y los espectros crecían más lentamente (Fig. 51).

Es necesario mencionar que los espectros no fueron estrictamente crecientes, probablemente por problemas relacionados con el trabajo en continuo. Sin embargo, los espectros se van agrupando en familias con valores crecientes de absorbancias (Fig. 52).

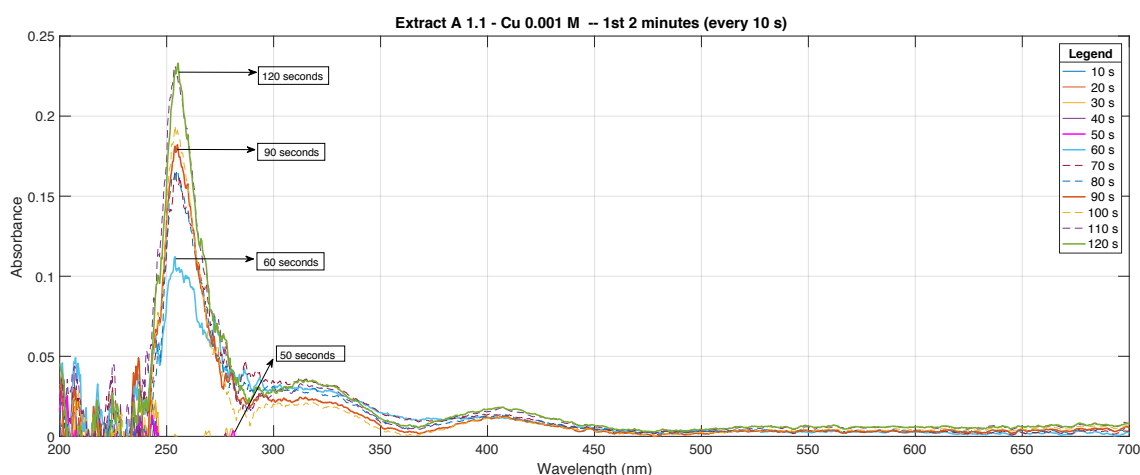


Fig. 50. UV-Vis primeros 2 minutos.

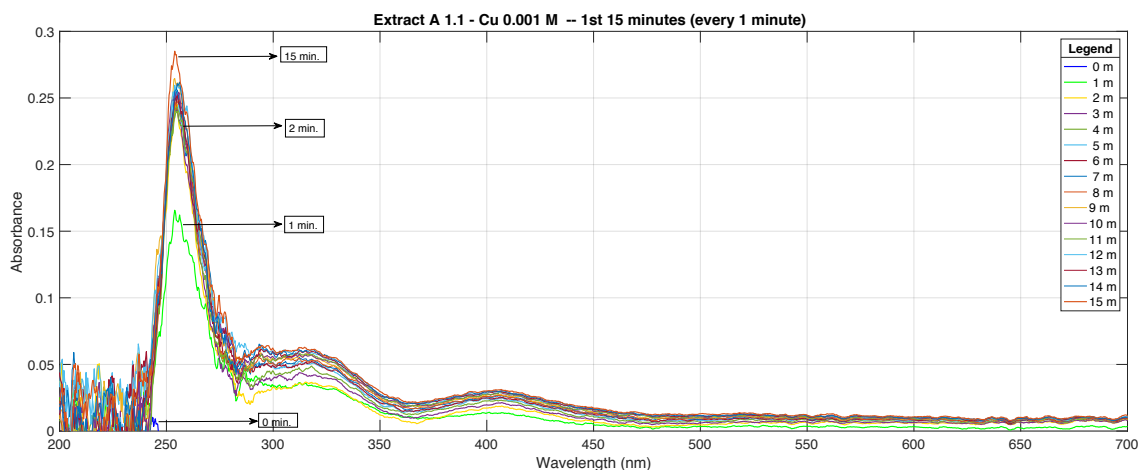


Fig. 51. UV-Vis primeros 15 min.

Se fueron registrando espectros de absorbancia cada 10 s durante dos horas. Los valores mostrados en la Fig. 52 son exactamente los que se guardaron en el instante en que se cumplieron los minutos señalados, salvo el del minuto 0 que se corresponde a los primeros 10 s.

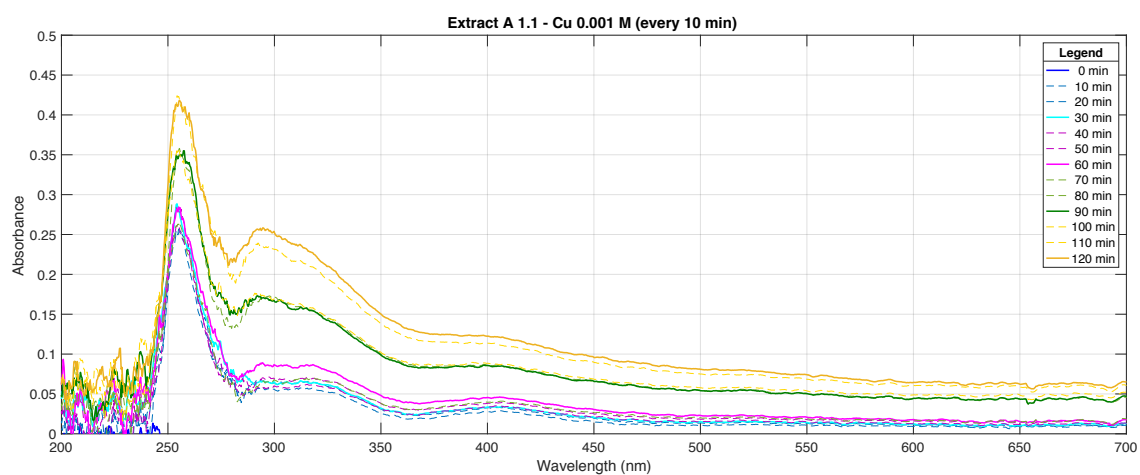


Fig. 52. UV-Vis cada 10 min durante 2 h.

9 Evaluación del impacto ambiental

Para analizar el impacto ambiental, se verán por separado las etapas de preparación del extracto y la síntesis de nanopartículas.

Por una parte, en la preparación del extracto se parte de un residuo vegetal donde no hay involucrados agentes químicos y los nuevos residuos generados son relativamente inocuos (Kharissova et al., 2013). Pero se debe tener en cuenta que son productos orgánicos que pueden servir de medio para la proliferación de organismos patógenos. Es entonces recomendable estar protegido de ellos en todo momento que se los manipula, e intentar controlar las condiciones de almacenamiento. Esta etapa es positiva medioambientalmente ya que se recupera un residuo sin formarse otro más tóxico en el proceso.

La síntesis de nanopartículas presenta retos particulares, ya que se está trabajando con metales pesados, algunos con un elevado grado de toxicidad intrínseca.

Si bien es cierto que mientras se encuentran en forma de nanopartículas gran parte de estos metales no son tóxicos, algunos de ellos tienen una estabilidad baja a pesar del extracto. Esto comporta que pueden volver a la forma iónica.

Además de lo anterior, las nanopartículas comportan otro reto importante, su separación del material biológico (Nagajyothi & Sreekanth, 2015), lo que podría comportar riesgos para la salud debido a la bioacumulación.

En el caso de las aguas de minas, la síntesis de nanopartículas es especialmente positiva ya que se trata de una acción de remediación. Como se ha visto en los espectros UV-Vis a partir de ciertas proporciones cationes/extracto se produce una precipitación macroscópica de metales. Si bien este escenario no interesa respecto a la producción de nanopartículas, tampoco es perjudicial para el medioambiente debido a su labor remediadora del agua.

Otros elementos a considerar son los reactivos para la caracterización del extracto. Ninguno de ellos es especialmente tóxico, y su correcta disposición acaba con el problema que podrían suponer.

En general se puede afirmar que los procesos estudiados en este trabajo son medioambientalmente amigables y generan un impacto positivo.

10 Planificación temporal y económica

La planificación temporal está basada en una dedicación de 800 h correspondientes al TFM ampliado 30 ECTS (12+18).

10.1 Planificación temporal

El proyecto fue realizado en el cuatrimestre de primavera del año académico 2016/2017. En el diagrama de Gantt (Fig. 53) se lista las fecha en que se llevaron a cabo cada una de las actividades y en la Tabla 6 la duración aproximada que tuvieron en horas.

Las actividades listadas incluyen solamente las estrictamente relacionadas con la consecución del proyecto.

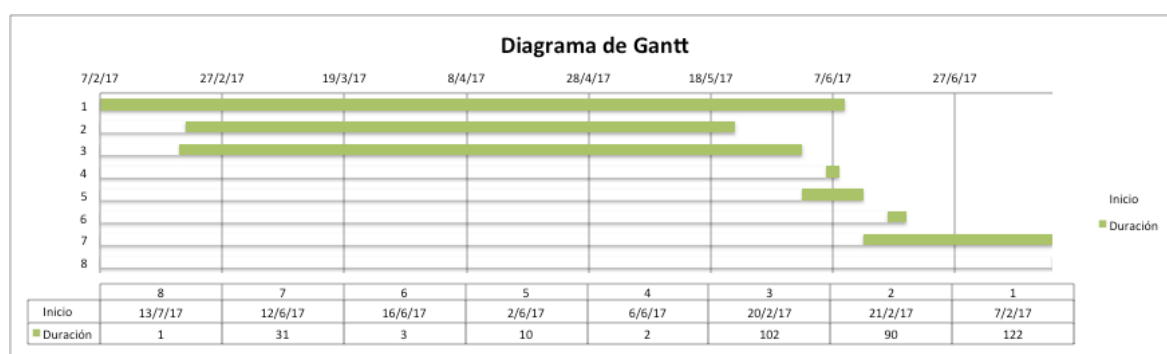


Fig. 53. Diagrama de Gantt con la planificación temporal.

Actividad	Tarea	Horas
1	Búsqueda bibliográfica	80 h
2	Preparación de experimentos	20 h
3	Trabajo experimental	626 h
4	Caracterización SEM/EDX	3 h
5	Redacción	50 h
6	Edición final	10 h
7	Preparación exposición	10 h
8	Exposición	1 h
TOTAL		800 h

Tabla 6. Horas aproximadas dedicadas al proyecto

10.2 Planificación económica

La planificación económica contempla los gastos de personal, material de laboratorio, y coste de los análisis, etc.

En la tabla siguiente se puede ver el cálculo aproximado del proyecto desglosado en conceptos y el importe total del proyecto.

Concepto	Cantidad	Coste unitario	Coste
Personal			
Ingeniero.	800 h	35 €/h	28.000,00 €
Director	200	50 €/h	10.000,00 €
Software			
Matlab	1 und	405 €/und	405,00 €
Office	4 meses	12,42 €/mes	49,68 €
Instrumentos Amortización			
UV-Vis	83,33 €/mes	5000 €/und	333,33 €
Sesiones SEM			
SEM	4 h	200 €/h	800,00 €
Material			
Reactivos y material	500 €		500,00 €
Material oficina	50 €		50,00 €
TOTAL			40.138,01 €

Tabla 7. Presupuesto del proyecto.

11 Recomendaciones para investigaciones Futuras

Las investigaciones futuras deberían estar encaminadas, en una primera etapa, hacia el estudio de la factibilidad del uso de nanopartículas de cobre en la modificación de sensores, por ejemplo.

En una segunda etapa, se podría investigar vías de separación de los metales de las aguas de minas para poder sintetizar nanopartículas con ellas de la manera más controlada posible.

Y en la tercera etapa, se podría incidir en el uso de las aguas de minas en la síntesis de nanopartículas.

Dentro de los comportamientos estudiados en este trabajo, haría falta la ampliación de los siguientes puntos:

- La determinación del tiempo de reacción total en la formación de nanopartículas. Las dos horas estudiadas en la mayoría de los casos fueron insuficientes.
- Evolución de la capacidad estabilizadora del extracto, mediante la observación UV-Vis con el paso de los días.
- Relacionar claramente los espectros UV-Vis con características del extracto como el contenido de polifenoles, azúcares reductores, pH.
- La monitorización temporal UV-Vis de la formación de nanopartículas a otras temperaturas.
- Probar la posibilidad de sintetizar semillas de nanopartículas y hacerlas crecer en condiciones diferentes (temperaturas, extractos, concentraciones, etc).
- Probar la posibilidad de sintetizar nanopartículas huecas o bimetálicas, usando semillas de nanopartículas de otro metal.

12 Conclusiones

En este trabajo se ha llegado a varias conclusiones, la primera de ella es que la cantidad de polifenoles que se puede extraer es mayor en los pedicelos que en el raquis del raspo de uva, al menos, claramente para las fracciones Φ superiores a 0,25 mm. Sin embargo el raquis contiene más azúcares reductores y la dispersión de sus valores de concentración es menor.

Solamente pudieron visualizarse mediante espectroscopia UV-Vis los plasmones de resonancia de las nanopartículas de cobre; ni el zinc ni el cadmio mostraron espectros que indicaran la formación de nanopartículas.

En la síntesis de nanopartículas de cobre con bajas concentraciones de cobre y extracto, el espectro UV-Vis aumenta su máximo de absorbancia, a medida que aumenta la concentración de disolución de cobre añadida.

En cambio, si se mantiene la concentración de la disolución de cobre y se aumenta la cantidad de extracto, se produce un desplazamiento del máximo de absorbancia hacia longitudes de onda más largas. No se observaron incrementos sensibles de la absorbancia en este caso.

También se determinó que la temperatura a la cual se realiza el análisis UV-Vis en el rango de 4° C-80° C, no influye en la señal de absorbancia. Temperaturas fuera de ese rango no fueron estudiadas.

Finalmente se observó que un filtrado final de las disoluciones de nanopartículas, cuando se trabaja con extractos diluidos y disoluciones de cobre diluidas, no es necesario. En cambio si se empieza a aumentar la concentración de la disolución de cobre el efecto del filtrado sigue siendo bajo hasta llegar a una concentración límite, la cual coincide con el inicio de la precipitación del cobre.

Agradecimientos

En primer lugar quiero expresar mi gratitud a mi director Antonio Florido del Departamento de Ingeniería Química de la UPC, por su guía, dedicación y paciencia; también a María Martínez y a Julio Bastos, del mismo departamento, por los consejos brindados.

Quiero agradecer a Isabel Villaescusa y a Nuria Fiol del Departamento de Ingeniería Química, Agraria y Tecnología Agroalimentaria de la Universitat de Girona por sus valiosas recomendaciones en la preparación de los extractos y la síntesis de nanopartículas. Además Agradezco también a Aguasanta M. Sarmiento del Departamento de Ciencias de la Tierra de la Universidad de Huelva por proporcionarme las aguas ácidas de mina usadas en la síntesis.

Doy las gracias también a mis compañeros de laboratorio: Cristina, Héctor, Lulú, Karina, Josep, y Dea, y a toda mi familia por el apoyo recibido.

Este trabajo se pudo llevar a cabo como contribución al proyecto "Síntesis Verde de Nanopartículas Metálicas a partir de Aguas Ácidas de Mina y Extractos de Residuos Agroalimentarios", financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y los fondos FEDER.

Lista de figuras

Fig. 1. Tipos de nanoestructuras. (Murty et al., 2013)	14
Fig. 2. Fase de activación.	16
Fig. 3. Fase de crecimiento.	16
Fig. 4. Fase de estabilización.	16
Fig. 5. Montaje del espectrómetro Flame-S. (Ocean Optics, 2015)	21
Fig. 6. Esquema de funcionamiento del SEM. (Western Washington University, 2014)	23
Fig. 7. Ejemplo de espectro obtenido por EDX.(Oxford Instruments Analytical, 2006)	24
Fig. 8. Esquema del proceso EDX. (Wikipedia, n.d.)	24
Fig. 9. Raspo de uva, compuesto por el raquis y los pedicelos.	25
Fig. 10. Secado del raspo de uvas en la estufa.	26
Fig. 11. Triturado del raspo de uva.	27
Fig. 12. Tamizado del raspo de uva para separarlo en 3 fracciones.	27
Fig. 13 Montaje final de la extracción por reflujo.	29
Fig. 14 Primer filtrado del extracto.	30
Fig. 15. Filtrado al vacío.	31
Fig. 16. Patrones de ácido gálico para obtener la recta de calibrado.	31
Fig. 17. Recta de calibrado GAE.	33
Fig. 18. Formas de la glucosa en disolución.	35
Fig. 19. Síntesis de nanopartículas en tubos de ensayo de 10 ml.	41
Fig. 20. Montaje de síntesis de nanopartículas con monitorización UV-Vis.	42
Fig. 21. Polifenoles pedicelos-raquis.	43
Fig. 22. Polifenoles tamaño de fracción de raspo de uva.	43
Fig. 23. Azúcares reductores pedicelos-raquis.	44
Fig. 24. Azúcares Reductores tamaño de fracción de raspo de uva.	44
Fig. 25. pH pedicelos-raquis.	44

Fig. 26. pH tamaño de fracción de raspo de uva. _____	45
Fig. 27. UV-Vis CuNP. _____	46
Fig. 28. UV-Vis Concentraciones crecientes A1.1. Cu (0,001 M-0,007 M). _____	47
Fig. 29. UV-Vis Concentraciones crecientes A1.1. Cu (0,006 M-0,010 M) _____	47
Fig. 30. Concentraciones crecientes A1.1, inmediatamente después de la síntesis. ____	48
Fig. 31. Concentraciones crecientes A1.1, 1 día después de la síntesis. _____	48
Fig. 32. UV-Vis proporción de extracto. _____	49
Fig. 33. UV-Vis proporción de extracto y concentración de Cu. _____	49
Fig. 34. UV-Vis Extracto fracción grande. _____	50
Fig. 35. UV-Vis Extracto fracción intermedia. _____	50
Fig. 36. UV-Vis Extracto fracción fina. _____	51
Fig. 37. UV-Vis efecto del tiempo 10 ml. _____	52
Fig. 38. UV-Vis efecto del filtrado 20 min. _____	53
Fig. 39. UV-Vis efecto del tiempo 80 min. _____	53
Fig. 40. UV-Vis efecto del filtrado-concentraciones _____	54
Fig. 41. SEM Muestra de nanopartículas de cobre filtrada, Extracto A3.3. _____	54
Fig. 42. SEM tamaño de las nanopartículas de cobre filtradas. _____	55
Fig. 43. EDX Análisis elemental. _____	55
Fig. 44. UV-Vis efecto de la temperatura de análisis. _____	56
Fig. 45. UV-Vis Mina Cueva de La Mora. _____	57
Fig. 46. UV-Vis Mina Peña del Hierro. _____	57
Fig. 47. UV-Vis Mina Tharsis. _____	57
Fig. 48. SEM Mina 2 (1 ml). _____	58
Fig. 49. EDX Mina 2 (1 ml). _____	58
Fig. 50. UV-Vis primeros 2 minutos. _____	59
Fig. 51. UV-Vis primeros 15 min. _____	59

Fig. 52. UV-Vis cada 10 min durante 2 h. _____ 60

Fig. 53. Diagrama de Gantt con la planificación temporal. _____ 63

Lista de tablas

Tabla 1. Extracciones realizadas. _____ 29

Tabla 2. Absorbancias obtenidas de los espectros de los patrones de ácido gálico. _____ 32

Tabla 3. Contenido en polifenoles de cada extracto. _____ 34

Tabla 4. Contenido en azúcares reductores de cada extracto. _____ 37

Tabla 5. pH de los extractos. _____ 38

Tabla 6. Horas aproximadas dedicadas al proyecto _____ 63

Tabla 7. Presupuesto del proyecto. _____ 64

Lista de ecuaciones

Ecuación 1. Contenido GAE de los extractos a partir de la absorbancia. _____ 34

Ecuación 2. Cálculo de los azúcares reductores. _____ 35

Bibliografía

- Aherne, D., Cara, M., Kelly, J. M., & Gun'Ko, Y. K. (2010). From Ag nanoprisms to triangular AuAg nanoboxes. *Advanced Functional Materials*, 20(8), 1329–1338. <http://doi.org/10.1002/adfm.200902030>
- Al-Kazazz, F. F. M., Al-Imarah, K. A. F., Al-Hasnawi, I. A., Agelmashotjafar, L., & Abdul-Majeed, B. A. (2013). A Simple Method for Synthesis , Purification and concentration Stabilized Goldnanoparticles. *Int. Journal of Engineering Research and Applications*, 3(6), 21–30. Retrieved from http://www.ijera.com/papers/Vol3_issue6/D362130.pdf
- American Chemical Society ACS. (n.d.-a). 12 Principles of Green Chemistry. Retrieved June 9, 2017, from <https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/what-is-green-chemistry/principles/12-principles-of-green-chemistry.html>
- American Chemical Society ACS. (n.d.-b). Green Chemistry Definition. Retrieved June 9, 2017, from <https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/what-is-green-chemistry/definition.html>
- Bankar, A., Joshi, B., Kumar, A. R., & Zinjarde, S. (2010). Banana peel extract mediated novel route for the synthesis of silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 368(1–3), 58–63. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.07.024>
- Baruwati, B., & Varma, R. (2009). High Value Products from Waste: Grape Pomace Extract???A Three-in-One Package for the Synthesis of Metal Nanoparticles. *ChemSusChem*, 2(11), 1041–1044. <http://doi.org/10.1002/cssc.200900220>
- Benito Sáez, P. (2015). Urbina Vinos Blog: Técnicas de Análisis Físico-Químico en Enología. Retrieved May 30, 2017, from <http://urbinavinos.blogspot.com.es/2015/12/tecnicas-de-analisis-fisico-quimico-en.html>
- Blom, J., & Rosted, C. O. (1947). On the determination of Reducing Sugars. *Acta Chemica Scandinavica*, 1, 32–53. <http://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.01-0032>
- Cajori, F. A. (1922). The use of iodine in the determination of glucose, fructose, sucrose, and maltose. *Journal of Biological Chemistry*, (54), 617–627. Retrieved from <http://www.jbc.org/content/54/3/617.citation>
- Cantoni, M. (2010). Electron Microscopy. *Experimental Methods in Physics*. Retrieved from

<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=55317177d685cc7f748b45d9&assetKey=AS%3A273759599038468%401442280782372>

- Caroling, G., Nithya Priyadharshini, M., Vinodhini, E., Mercy Ranjitham, A., & Shanthi, P. (2015). Biosynthesis of copper nanoparticles using aqueous guava extract - Characterization and study of antibacterial effects. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 5(2), 25–43.
- Castro, L., Blázquez, M. L., González, F., Muñoz, J. a., & Ballester, A. (2010). Extracellular biosynthesis of gold nanoparticles using sugar beet pulp. *Chemical Engineering Journal*, 164(1), 92–97. <http://doi.org/10.1016/j.cej.2010.08.034>
- Clark, J. (2004). Oxidation of aldehydes and ketones. Retrieved June 14, 2017, from <http://www.chemguide.co.uk/organicprops/carbonyls/oxidation.html>
- Dang, T. M. D., Le, T. T. T., Fribourg-Blanc, E., & Dang, M. C. (2011). Synthesis and optical properties of copper nanoparticles prepared by a chemical reduction method. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 2(1), 015009 (6 pp). <http://doi.org/10.1088/2043-6262/2/1/015009>
- Downey, M. L., Moore, D. T., Bachula, G. R., Etter, D. M., Carey, E. F., & Perine, L. A. (2000). *National Nanotechnology Initiative: Leading To the Next Industrial Revolution*. National Nanotechnology Initiative. Washington, D.C.
- Egerton, R. F. (2005). *Physical Principles of Electron Microscopy*. Boston, MA: Springer US. <http://doi.org/10.1007/b136495>
- Filippo, E., Serra, A., Buccolieri, A., & Manno, D. (2010). Green synthesis of silver nanoparticles with sucrose and maltose: Morphological and structural characterization. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 356(6–8), 344–350. <http://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2009.11.021>
- Gerits, N. (2016). *Synthesis of copper nanoparticles using grape stalk and spent coffee extract*. UC Leuven-Limburg, Universitat de Girona. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10256/13232>
- Gross, S. (2015). *Sustainable and Very-Low-Temperature Wet-Chemistry Routes for the Synthesis of Crystalline Inorganic Nanostructures*. (V. A. Basiuk & E. V Basiuk, Eds.) *Green Processes for Nanotechnology* (1st ed.). Cham: Springer International Publishing. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-15461-9>

- Hart, J. (2009). ME 599 - Nanomanufacturing. USA: University of Michigan. Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=1bcPqQGRNA4>
- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638. <http://doi.org/10.1039/c1gc15386b>
- Kharissova, O. V., Dias, H. V. R., Kharisov, B. I., P?rez, B. O., & P?rez, V. M. J. (2013). The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 31(4), 240–248. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.003>
- Link, S., & El-Sayed, M. A. (1999). Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(21), 4212–4217. <http://doi.org/10.1021/jp984796o>
- M. Awwad, A., M. Salem, N., & O. Abdeen, A. (2013). Biosynthesis of Silver Nanoparticles using *Olea europaea* Leaves Extract and its Antibacterial Activity. *Nanoscience and Nanotechnology*, 2(6), 164–170. <http://doi.org/10.5923/j.nn.20120206.03>
- Machado, S., Pacheco, J. G., Nouws, H. P. A., Albergaria, J. T., & Delerue-Matos, C. (2015). Characterization of green zero-valent iron nanoparticles produced with tree leaf extracts. *Science of The Total Environment*, 533, 76–81. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.091>
- Machado, S., Pinto, S. L., Grosso, J. P., Nouws, H. P. A., Albergaria, J. T., & Delerue-Matos, C. (2013). Green production of zero-valent iron nanoparticles using tree leaf extracts. *Science of The Total Environment*, 445–446, 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.033>
- Makarov, V. V., Love, A. J., Sinitsyna, O. V., Makarova, S. S., Yaminsky, I. V., Talianky, M. E., & Kalinina, N. O. (2014). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae*, 6(1 (20)), 35–44. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3999464/?tool=pmcentrez>
- Mehranpour, H., Askari, M., Ghamsari, M. S., & State, S. (2012). LaMer theory approach to study the nucleation and growth of sol-gel derived TiO₂ nanoparticles. *Proceedings of the 4th International Conference on Nanostructures (ICNS4)*.
- Merlijn van Spengen, W., Sueko, K., Sugawara, Y., Sullivan, B., Sun, Y., Swanson, P., ... Zysset, P. K. (2010). *Springer Handbook of Nanotechnology*. (B. Bhushan, Ed.) (3rd ed., Vol. 3rd). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-02525-9>

- Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2), 346–356. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
- Moore, A., & Goettmann, F. (2006). The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. *New Journal of Chemistry*, 30(8), 1121. <http://doi.org/10.1039/b604038c>
- Morris, V. H., & Wesp, E. F. (1932). Methods of determining glucose and fructose in corn tissues. *Plant Physiology*, 7(1), 47–62. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC439790/?page=1>
- Murty, B. S., Shankar, P., Raj, B., Rath, B. B., & Murday, J. (2013). *Textbook of Nanoscience and Nanotechnology* (1st ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-28030-6>
- Mystrioti, C., Xanthopoulou, T. D., Tsakiridis, P., Papassiopi, N., & Xenidis, A. (2016). Comparative evaluation of five plant extracts and juices for nanoiron synthesis and application for hexavalent chromium reduction. *Science of The Total Environment*, 539, 105–113. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.091>
- Nagajyothi, P. C., & Sreekanth, T. V. M. (2015). Green Synthesis of Metallic and Metal Oxide Nanoparticles and Their Antibacterial Activities. In V. A. Basiuk & E. V. Basiuk (Eds.), *Green Processes for Nanotechnology* (1st ed., pp. 99–117). Cham: Springer International Publishing. http://doi.org/10.1007/978-3-319-15461-9_4
- nano Composix. (2012). UV/Vis/IR Spectroscopy Analysis of Nanoparticles. *nanoComposix*. San Diego.
- Ocean Optics. (2015). Flame Miniature Spectrometer User Manual.
- Oxford Instruments Analytical. (2006). INCA Energy Operator Manual. Oxford Instruments Analytical. Retrieved from https://investigacion.us.es/docs/web/files/manual_instrucciones_eds_inca.pdf
- Panigrahi, S., Kundu, S., Ghosh, S., Nath, S., & Pal, T. (2004). General method of synthesis for metal nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 6(4), 411–414. <http://doi.org/10.1007/s11051-004-6575-2>
- Paulino Silva, L., Garcez Reis, I., & Caetano Bonatto, C. (2015). *Green Synthesis of Metal Nanoparticles by Plants: Current Trends and Challenges*. (V. A. Basiuk & E. V. Basiuk,

- Eds.) *Green Processes for Nanotechnology* (1st ed.). Cham: Springer International Publishing. <http://doi.org/10.1007/978-3-319-15461-9>
- Poole, C. P. J., & Owens, F. J. (2003). *Introduction to Nanotechnology*. (John Wiley & Sons, Ed.) (1st ed.). Wiley.
- Pujol, D., Liu, C., Fiol, N., Olivella, M., Engels, G., Gominho, J., Villaescusa, I., & Pereira, H. (2013). Chemical characterization of different granulometric fractions of grape stalks waste. *Industrial Crops and Products*, 50(October), 494–500. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.051>
- Quester, K., Avalos-Borja, M., & Castro-Longoria, E. (2013). Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*, 54–55, 1–27. <http://doi.org/10.1016/j.micron.2013.07.003>
- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76–83. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>
- Ramsden, J. (2011). *Nanotechnology: An Introduction (Micro and Nano Technologies)*.
- Rao, K. J., & Paria, S. (2015). Aegle marmelos Leaf Extract and Plant Surfactants Mediated Green Synthesis of Au and Ag Nanoparticles by Optimizing Process Parameters Using Taguchi Method. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3(3), 483–491. <http://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00022>
- Raveendran, P., Fu, J., & Wallen, S. L. (2003). Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 125(46), 13940–13941. <http://doi.org/10.1021/ja029267j>
- Russo, R. (2011). Wine Analysis Lab II: Redox Titration for Reducing Sugars Ruth Russo. Retrieved May 30, 2017, from <http://web.wvcc.edu/ruthrusso/files/2011/05/Reducing-Sugars2.pdf>
- Varshney, R., Bhadauria, S., Gaur, M. S., & Pasricha, R. (2010). Characterization of copper nanoparticles synthesized by a novel microbiological method. *JOM*, 62(12), 102–104. <http://doi.org/10.1007/s11837-010-0171-y>
- Vilela, D., González, M. C., & Escarpa, A. (2011). Formación in situ de nanopartículas de oro empleando antioxidantes naturales. *Actualidad Analítica*, 36(Diciembre), 14. Retrieved from <http://seqa.es/ActualidadAnalitica/Ano2011Numero36.pdf>

- Western Washington University. (2014). Basic Operating Principles: Scanning Electron Microscope User Training. Retrieved from <https://wwwuphoto.files.wordpress.com/2014/01/sem-training-2.pdf>
- Wikipedia. (n.d.). Energy-dispersive X-ray spectroscopy. Retrieved June 21, 2017, from https://en.wikipedia.org/wiki/Energy-dispersive_X-ray_spectroscopy
- Xiong, J., Wang, Y., Xue, Q., & Wu, X. (2011). Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using l-ascorbic acid. *Green Chemistry*, 13(4), 900–904. <http://doi.org/10.1039/c0gc00772b>
- Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2011). Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere*, 82(4), 489–494. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.023>